

Generierung und Charakterisierung Claudin-16- und Claudin-10-defizienter Mäuse

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochemikerin Constanze Will

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. PD Dr. Barbara Tzschentke
 2. PD Dr. Dominik Müller
 3. Prof. Dr. Michael Fromm

eingereicht: 28.09.2010

Datum der Promotion: 18.02.2011

Abstract

Claudin tight junction proteins are essential components in the regulation of paracellular fluxes through epithelial layers. In the kidney, claudins contribute to the resorption of ions in urine formation. This thesis highlights the physiological role of two renally expressed family members, claudin-16 and claudin-10. Via a conditional gene targeting approach, murine *Cldn16* and *Cldn10* deficiency strains have been generated and evaluated with respect to their phenotype, with a focus on the renal function.

Claudin-16 has been attributed to the resorption of bivalent ions in the thick ascending limb of Henle's loop. Protein malfunction in humans goes in hand with FHHNC, a genetic disorder characterized by renal loss of bivalent ions, finally leading to nephrocalcinosis and end stage renal disease. Claudin-16 deficient mice display similar electrolyte disorders as human patients, but also resemble compensatory mechanisms on physiological, endocrinological and transcriptional levels to prevent the progression of the disease state. Hence, *Cldn16*^{-/-} mice serve as an adequate model to study renal salt wasting as well as counterregulatory mechanisms which highlights molecular pathways underlying salt wasting in the kidney. Additionally, we could identify putative transport proteins which are attractive candidates for transcellular magnesium transport in the kidney.

Claudin-10 shows a wide distribution in various tissues, its physiological role, however, is still under evaluation. Mice lacking claudin-10 display a lethal phenotype shortly after birth. Investigations of renal and pulmonary histology has not yet revealed the cause for the mortality under claudin-10-deficiency. However, urine analysis suggests an imbalance in the magnesium homeostasis in these animals. By subsequent conditional gene knockout approaches, this model will serve as a basis for tissue specific claudin-10 ablation and thereby enables investigation into the contribution of claudin-10 to distinct organ functions.

Keywords:

Claudin-16, claudin-10, knockout, kidney, FHHNC

Schlagwörter:

Claudin-16, Claudin-10, Knockout, Niere, FHHNC

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Die Niere und ihre Funktion	- 1 -
1.2	Epitheliale Transportprozesse	- 4 -
1.3	Die Tight Junction	- 6 -
1.4	Die Claudin-Familie	- 7 -
1.5	Claudin-16	- 10 -
1.6	Claudin-10	- 12 -
1.7	Claudine: Poren- und Barrierebildung	- 14 -
1.8	Knockout-Mäuse: Grundlagen und Anwendung in der Funktionsaufklärung von Claudinen	- 17 -
2	Zielsetzung	- 21 -
3	Material und Methoden	- 23 -
3.1	Materialien	- 23 -
3.1.1	Standardchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	- 23 -
3.1.2	Reagenzien für Molekularbiologie, Zellbiologie und Proteinchemie	- 23 -
3.1.3	Puffer, Medien, Lösungen	- 24 -
3.1.4	Primer	- 24 -
3.1.5	Bakterienstämme, Zell- und Mauslinien	- 24 -
3.1.6	Antikörper	- 25 -
3.2	Molekularbiologische Methoden	- 26 -
3.2.1	Präparation genomischer DNA	- 26 -
3.2.2	Schnellpräparation von genomischer DNA zur Genotypisierung	- 26 -
3.2.3	Präparation von Plasmid-DNA	- 26 -
3.2.4	Quantifizierung von DNA	- 26 -
3.2.5	DNA-Sequenzierung	- 27 -
3.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 27 -
3.2.7	Rekombinante PCR	- 27 -
3.2.8	Restriktionsverdau	- 28 -
3.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	- 28 -
3.2.10	Ligation	- 28 -
3.2.11	Transformation	- 29 -
3.2.12	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	- 29 -
3.2.13	<i>Southern blotting</i> und Radiomarkierung	- 29 -
3.2.14	Präparation von RNA	- 30 -
3.2.15	Gewinnung von cDNA	- 31 -
3.2.16	Quantitative PCR	- 31 -
3.2.17	Markierung von RNA für Microarray-Analysen	- 32 -
3.2.18	Generierung des <i>Cldn10</i> Targetingvektors	- 33 -
3.2.19	Generierung des <i>Cldn16</i> Targetingvektors	- 34 -
3.3	Zellkulturarbeiten	- 36 -
3.3.1	Allgemeines	- 36 -
3.3.2	Kultivieren und Inaktivieren muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)	- 36 -
3.3.3	Präparation von MEFs	- 36 -
3.3.4	Trypsinieren und Passagieren von MEFs	- 37 -
3.3.5	Einfrieren und Auftauen von MEFs	- 37 -
3.3.6	Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	- 37 -
3.3.7	Präparation muriner ES-Zellen	- 38 -
3.3.8	Trypsinieren und Passagieren von ES-Zellen	- 38 -
3.3.9	Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	- 38 -
3.3.10	Elektroporation von ES-Zellen und Isolation einzelner Klone	- 38 -
3.3.11	Blastozysteninjektion und -transfer in scheinschwangere Ammen	- 39 -
3.4	Tierexperimentelle Arbeiten und Gewebepreparationen	- 39 -
3.4.1	Allgemeines	- 39 -
3.4.2	Generierung transgener Linien und Zucht	- 40 -
3.4.3	Gewinnen und Vermessen von Blut- und Urinproben	- 40 -
3.4.4	Organentnahme und -aufbereitung	- 41 -
3.4.5	Präparation von Tubulussegmenten für transepitheliale Messungen	- 42 -
3.4.6	Analyse von Lungenparametern in murinen Neonaten	- 43 -
3.4.7	Genehmigungen für tierexperimentelle Arbeiten	- 43 -

3.5	Proteinchemische und histologische Methoden	- 43 -
3.5.1	Proteinpräparation	- 43 -
3.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	- 43 -
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 44 -
3.5.4	Western Blot	- 44 -
3.5.5	Präparation von Gewebeschnitten	- 44 -
3.5.6	Immunfluoreszenzanalysen an Cryoschnitten	- 45 -
3.5.7	Detektion von Gewebekalzifizierungen	- 45 -
3.5.8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Kern-Plasma-Färbung)	- 45 -
3.6	Statistik, Bioinformatik und computergestützte Analysen	- 46 -
3.6.1	Statistik	- 46 -
3.6.2	Auswertung von Expressionsprofilen	- 46 -
3.6.3	Computergestützte Analysen	- 46 -
4	Ergebnisse	- 48 -
4.1	Knockout des murinen Gens <i>Cldn16</i>	- 48 -
4.1.1	Generierung der <i>Cldn16</i> -Targetingkonstrukte	- 48 -
4.1.2	<i>Cldn16</i> : ES-Zell-Targeting und Erstellung der transgenen Linie	- 51 -
4.1.3	Nachweis der Abwesenheit von Claudin-16	- 52 -
4.2	<i>Cldn16</i> - Physiologische Grundcharakterisierung	- 53 -
4.2.1	Vitalität und Fruchtbarkeit	- 53 -
4.2.2	Untersuchung des Ionenstoffwechsels	- 53 -
4.2.3	Hormonell regulierte Kompensation des Salzverlustes	- 55 -
4.2.4	Untersuchungen auf Nephrokalzinose	- 55 -
4.2.5	Transepitheliale Messungen an isolierten, perfundierten TAL-Segmenten ..	- 57 -
4.3	Transkriptomanalysen zur Aufklärung von renalen molekularen Mechanismen ...	- 58 -
4.3.1	Microarray-Expressionsanalysen	- 58 -
4.4	Knockout des murinen Gens <i>Cldn10</i>	- 62 -
4.4.1	Generierung des <i>Cldn10</i> -Targetingkonstrukts	- 62 -
4.4.2	<i>Cldn10</i> : ES-Zell-Targeting und Erstellung der transgenen Linie	- 63 -
4.4.3	Nachweis der Abwesenheit von Claudin-10	- 65 -
4.5	<i>Cldn10</i> - Physiologische Grundcharakterisierung	- 66 -
4.5.1	Vitalität und Fruchtbarkeit	- 66 -
4.5.2	Renale Funktion - Elektrolyte	- 67 -
4.5.3	Renale Morphologie - Histologien der Niere	- 69 -
4.5.4	Pulmonale Funktion – Lungenparameter	- 71 -
4.5.5	Pulmonale Morphologie – Histologien der Lunge	- 72 -
5	Diskussion	- 74 -
5.1	Tiermodelle zur Evaluation der <i>in vivo</i> -Funktion von Claudinen	- 74 -
5.1.1	Wahl des geeigneten Modells	- 74 -
5.1.2	Targetingstrategie des <i>Cldn16</i>	- 75 -
5.1.3	Targetingstrategie des <i>Cldn10</i>	- 76 -
5.2	Phänotypisierung Claudin-16-defizienter Mäuse	- 78 -
5.2.1	<i>Cldn16</i> : Zusammenfassung und Forschungsausblick	- 85 -
5.3	<i>Cldn10</i> – Phänotyp und Ansätze zur Aufklärung	- 87 -
5.3.1	<i>Cldn10</i> : Zusammenfassung und Forschungsausblick	- 91 -
6	Zusammenfassung	- 93 -
7	Anhang	- 95 -
7.1	Abkürzungen	- 95 -
7.2	Sequenzen und PCR-Programme	- 97 -
7.3	Elektrophysiologie	- 100 -
7.4	Messungen	- 101 -
8	Danksagung	- 102 -
9	Selbstständigkeitserklärung	- 104 -
10	Lebenslauf	- 105 -
11	Publikationen	- 106 -
12	Literatur	- 107 -

„Nichts auf der Welt ist so gerecht verteilt wie der Verstand. Denn jedermann ist überzeugt, dass er genug davon habe.“

(René Descartes)

1 Einleitung

1.1 Die Niere und ihre Funktion

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ im Organismus der Vertebraten und besitzt vielfältige physiologische Funktionen:

- I. Im Rahmen der Harnbildung wird die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten geregelt, zudem wird über die Resorption von Ionen die Elektrolythomöostase reguliert.
- II. Eng gekoppelt an die Elektrolythomöostase, hat die Niere einen Einfluss auf Volumen und Osmolarität des Blutes, und trägt maßgeblich zur Blutdruckregulation bei.
- III. Neben der Lunge erfüllt auch die Niere eine wichtige Funktion bei der Regulation des Säure-Base-Haushaltes des Körpers, hauptsächlich über Sekretion und Resorption von Protonen (H^+) und Bikarbonat (HCO_3^-).
- IV. Die Niere ist Syntheseort verschiedener Hormone, wie etwa Calcitriol oder Erythropoietin. Umgekehrt ist die Niere auch Wirkungsort für verschiedene Hormone, z.B. reguliert das antidiuretische Hormon (ADH) die H_2O -Resorption und bestimmt dadurch das Urinvolumen. Aldosteron ist ein wichtiger Regulator der Natriumresorption in der Niere.

Diese physiologischen Aufgaben sind gekoppelt an unterschiedliche Vorgänge des Stofftransports (Resorption, Sekretion, Filtration), welche entlang des Nephrons stattfinden. Das Nephron ist die kleinste Funktionseinheit der Niere und besteht aus einem mit dem Blutkreislauf verbundenen System aus anatomisch, aber auch funktionell unterscheidbaren Nierentubulussegmenten (Abb. 1).

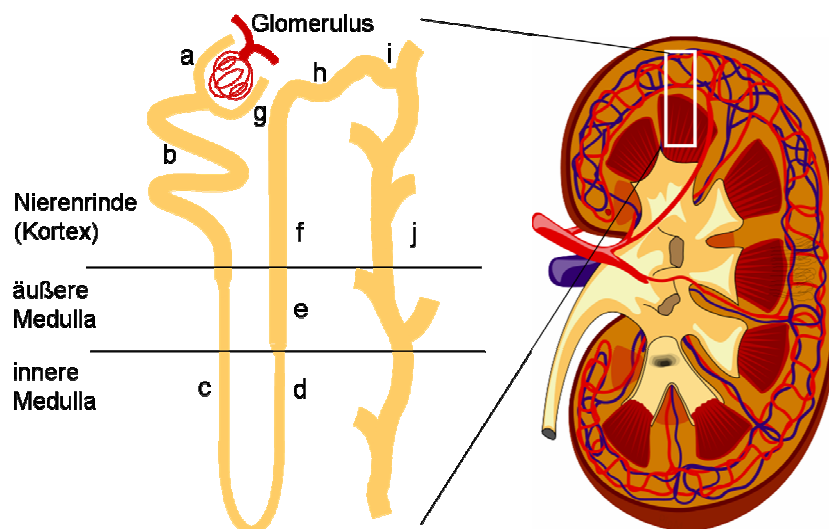


Abb. 1: Übersicht Nephronstruktur und Nierenlängsschnitt (nach P.M. Jaworski).

Dargestellt sind der Glomerulus, die Bowman-Kapsel (a) sowie die einzelnen Tubulusareale:

- (i) Der proximale Nephronabschnitt mit dem proximalen Tubulus (b),
- (ii) Die Henle-Schleife mit dem dünnen absteigenden Ast (c), dem dünnen aufsteigenden Ast (d), und dem dicken aufsteigenden Ast (e = medullär, f = kortikal),
- (iii) Der distale Nephronabschnitt mit dem Areal um die Macula Densa (g), dem distalen Tubulus (h) und dem Verbindungsstück (i), welches in das Sammelrohr (j) mündet.

Eine humane Niere besteht aus etwa einer Million Nephrone, deren Tubuli in das renale Interstitium eingebettet sind, einer Schicht aus Bindegewebe und Gefäßen im Zwischenraum benachbarter Nephronsegmente. Erster Kontaktpunkt zwischen Tubulussystem und Blutgefäßen ist das Nierenkörperchen. Es besteht aus (i) dem Glomerulus, einem Kapillarsystem, welches von der Vas afferens gespeist wird und in die Vas efferens mündet, sowie (ii) der Bowman-Kapsel, einem dreischichtigen Blatt, welches den Glomerulus umgibt. Das Blut wird gefiltert, indem niedermolekulare gelöste Substanzen (Solute) und Wasser die Blut-Harn-Schranke, bestehend aus Gefäßendothelzellen, Basalmembran und aus Podozyten gebildeten Schlitzmembran, passieren. Die Porengröße erlaubt eine Filtration von Molekülen bis zu einer Größe von 68 kDa. Nachfolgend wird der so gebildete Primärharn entlang des Tubulussystems transportiert und unterliegt dabei verschiedenen Resorptionsprozessen. Diese werden in den folgenden Absätzen der Reihe nach erläutert.

Der proximale Tubulus

Der proximale Tubulus (PT, proximal = nahe an, zugewandt) schließt sich dem Nierenkörperchen an, und lässt sich morphologisch in die Pars convoluta (kortikal lokalisiert) und die gestreckte Pars recta (medullär lokalisiert) unterteilen. Zellen des proximalen Tubulus zeichnen sich durch ihren luminalen Bürstensaum aus Mikrovilli aus und weisen eine hohe Anzahl an Mitochondrien auf, welche für die nachfolgend aufgeführten energieabhängigen Transportprozesse notwendig sind.

Funktionell ist der proximale Tubulus charakterisiert durch die Resorption des Hauptteils gelöster Substanzen des Primärharns. Nahezu vollständig werden Glukose und Aminosäuren zurückgewonnen [Maddox und Gennari, 1987], Proteine werden größtenteils wieder aufgenommen, bzw. zur Aufnahme in Aminosäuren zerlegt. Zusätzlich werden 2/3 des gelösten Natriums, Kaliums, Kalziums und Chlorids, sowie ein ebenso großer Anteil des gefilterten Wassers resorbiert [Berne und Levy, 2000]. Zudem wird etwa 70 % des ultrafiltrierten Phosphates im proximalen Tubulus rückgewonnen [Hernando et al., 2005]. Der Harn ist nach dem Durchlaufen des proximalen Tubulus isoosmotisch (= enthält die gleiche Anzahl gelöster Teilchen) zum renalen Interstitium.

Die Henle-Schleife

Der anschließende Tubulusabschnitt, die Henle-Schleife, verläuft haarnadelförmig und ist funktionell und anatomisch unterteilt in die Abschnitte „dünner absteigender Ast“ (*thin descending limb*, tDL), „dünner aufsteigender Ast“ (*thin ascending limb*, tAL), sowie „dicker aufsteigender Ast“ (*thick ascending limb*, TAL). Im Organismus der Säugetiere lassen sich Nierentubuli hinsichtlich ihrer Schleifengröße unterscheiden: Während kortikale Nephrone relativ kurze Henle-Schleifen im Bereich der Nierenrinde ausbilden,

ragen solche der juxtamedullären Nephronen (juxta = nahe an) bis tief ins Nierenmark. Diese anatomische Besonderheit ist notwendig für die Wasserresorption und ermöglicht die Konzentrierung des Harns.

Die Niere erzeugt durch einen Gegenstrommechanismus im Bereich der Henle-Schleife einen osmotischen Gradienten. Das medulläre Interstitium weist eine höhere Osmolalität auf als das Tubuluslumen und bildet somit ein hypertones Milieu. Der dünne absteigende Ast der Henle-Schleife ist durchlässig für Wasser und weist gleichzeitig eine eingeschränkte Permeabilität für Ionen und gelöste Moleküle auf [Kokko, 1970], so dass in diesem Segment die Rückgewinnung von Wasser bewirkt und der Harn konzentriert wird.

Im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife sind die Permeabilitäten umgekehrt: Dieser Bereich ist impermeabel für Wasser und die hohe Osmolalität des Harns wirkt als Triebkraft für die Resorption von NaCl. Insbesondere der dicke aufsteigende Ast ist mit der Rückgewinnung der einwertigen Ionen Natrium, Kalium und Chlorid beschrieben [Rocha und Kokko, 1973]. Viele Publikationen weisen dem TAL zusätzlich eine wichtige Aufgabe in der Resorption divalenter Kationen zu, wie kürzlich in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst [Günzel und Yu, 2009]: Etwa 20 % des Kalziums und 60 - 70 % des glomerulär gefilterten Magnesiums werden in diesem Segment zurückgewonnen [Davidson, 2008]. Nach Durchlaufen der Henle-Schleife sind diese aufgeführten Elektrolyte auf 10 - 15 % der Ausgangsmenge im Primärharn reduziert (Abb. 2).

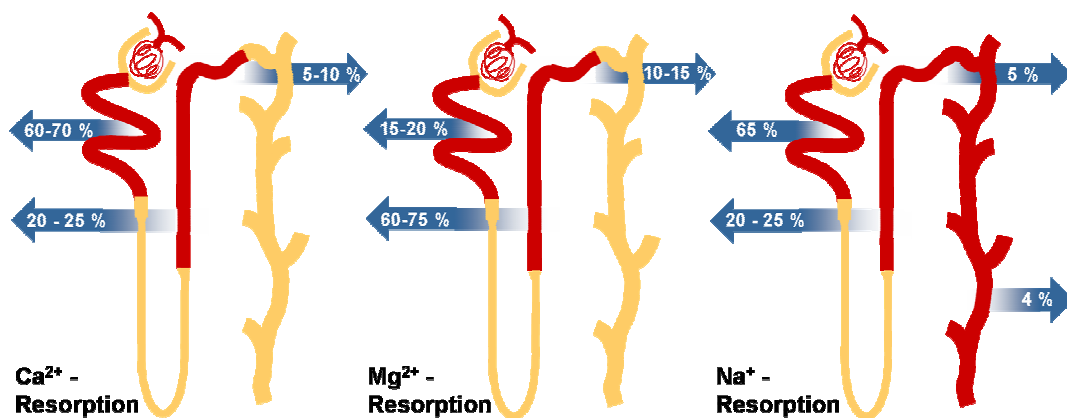


Abb. 2: Resorption von Ca^{2+} , Mg^{2+} und Na^+ entlang des Nierentubulus.

Pfeile markieren schematisch die Rückgewinnung der jeweiligen Ionen im proximalen Tubulus, im TAL, im distalen Konvolut und im Sammelrohr.

Das distale Nephron

Unter dem distalen Nephron (distal = entfernt, abgewandt) versteht man die Segmente des distalen Tubulus, des Verbindungsstücks (*connecting tubule*) und des Sammelrohrs [Dubose und Hamm, 2002]. Zellen des distalen Tubulus weisen morphologisch ein abgedichtetes Epithel mit einem schwach ausgeprägten Bürstensaum auf. Das Sammelrohr zeigt eine höhere morphologische Heterogenität; zwei Zellpopulationen

lassen sich im Sammelrohr unterscheiden: Die Hauptzellen (Prinzipalzellen), welche den prädominierenden Zelltyp ausmachen und im Zusammenhang mit Natrium- und Wasserresorption beschrieben sind, sowie die Schaltzellen (interkalierende Zellen), welche funktionell der Einstellung des Säure-Base-Gleichgewichts zuzuordnen sind [Dubose und Hamm, 2002].

Im distalen Nephron finden nur noch gezielte Ionenresorptionsprozesse statt, welche meist hormonell kontrolliert sind; wie etwa die parathormongesteuerte Kalziumresorption [Mensenkamp et al., 2007]. Das Verbindungsstück spielt ebenfalls eine Rolle im aktiven Kalziumtransport [Boros et al., 2009].

Ein Beispiel für die hormonelle Regulation der Ionenhomöostase bildet das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), eine hormonelle Kaskade der Regulation des Hypertonus mit vielfältigen Wirkorten, besonders der Natriumresorption im Sammelrohr. Eine unzureichende Versorgung des Organismus mit Natrium führt zu einer Verringerung von Blutvolumen und Blutdruck. Durch eine Aktivierung der Kaskade des RAAS kann Aldosteron-vermittelt eine verstärkte Natrium-Resorption im distalen Nephron bewirkt werden, wie kürzlich in einer Übersichtsarbeit dargelegt [Bie und Damkjaer, 2010]

Die Wasserresorption wird in diesem Bereich des Nephrons hormonell kontrolliert [Berne und Levy, 2000]. Hier finden auch Transportprozesse zur Regulation des Säure-Base-Gleichgewichtes statt: Über die Sekretion von Protonen, aber auch Bicarbonat, wird im Sammelrohr der pH-Wert des Urins eingestellt [Capasso et al., 1994]. Dem distalen Nephron kommt somit eine Funktion in der Feinregulation und genauen Abstimmung der Urinzusammensetzung zu.

Die hier beschriebenen Sekretions-, Resorptions- und Transportvorgänge setzen eine intakte Barriere zwischen Tubuluslumen und Interstitium voraus. Aus diesem Grund möchte ich im nachfolgenden Abschnitt auf Epithelien und ihre Funktion der Kompartimentierung näher eingehen, und auch noch mal die Prinzipien einzelner Stofftransporte aufgreifen.

1.2 Epitheliale Transportprozesse

Die Trennung verschiedener funktioneller Bereiche setzt komplexe Barrieren voraus. Diese Aufgabe wird gewährleistet durch endo- und epitheliale Verbände, welche sich in nahezu allen Geweben des Körpers befinden und für deren äußere Begrenzung, aber auch die Separation einzelner funktioneller Bereiche eine wichtige Rolle spielen.

Epithelien bestehen aus einer oder mehreren Zellschichten. Zellen in epithelialen Geweben weisen eine Polarität auf, d.h. eine Ausrichtung in eine apikale (dem Geweblumen zugewandte) und eine basolaterale (dem Interstitium zugewandte) Seite. Ihre Aufgabe besteht darin, eine Barriere zwischen zwei Kompartimenten zu bilden und

somit Diffusionsprozesse von gelösten Substanzen zu unterbinden oder zu ermöglichen. Zusätzlich zu ihrer Barrierefunktion weisen Epithelien jedoch auch oft eine spezifische Permeabilität für bestimmte Ionen und / oder Moleküle auf und kontrollieren somit die Passage bestimmter Solute zwischen den beiden abgegrenzten Kompartimenten. Ein Beispiel ist der Intestinaltrakt, dessen Epithel das Darmlumen vom darunter liegenden Gefäßsystem separiert, jedoch die Resorption von Ionen und organischen Molekülen (Aminosäuren, Glukose) über Transportmechanismen zulässt.

Epitheliale Transportvorgänge können hinsichtlich des Transportweges klassifiziert werden [Erlj, 1976]:

(i) Transzellulärer Transport wird vermittelt durch membranständige Kanäle oder Transporter auf der apikalen bzw. basolateralen Seite der Zelle, wodurch ein Traversieren des Ions oder Moleküls vom Lumen durch die Zelle auf die interstitielle Seite gewährleistet wird; ggf. wird dieser Vorgang unterstützt durch intrazelluläre Transporter mit *shuttle*-Funktion (Abb. 3a). Oft werden zwei oder mehr Komponenten im Rahmen eines Transportvorgangs passagiert, entweder in gleichgerichteter (Symport, Abb. 3c) oder gegensätzlicher (Antiport, Abb. 3d) Transportrichtung. Der Konzentrationsgradient der einen Komponente kann energieneutral für den Transport der anderen genutzt werden. Transmembran-Transportprozesse können aber auch aktiv unter ATP-Verbrauch, entgegen eines Gradienten, stattfinden (Abb. 3e, f).

(ii) Parazellulärer Transport geschieht durch den Spalt zwischen zwei Epithelzellen, entlang eines elektrochemischen Gradienten. Dieser Gradient resultiert aus einem Konzentrationsgefälle an gelöster Substanz; im Falle von geladenen Molekülen oder Elektrolyten bildet sich ein Potential zwischen apikaler und basolateraler Seite aus, welches als Triebkraft für den (passiven) Flux von Soluten durch den parazellulären Spalt entlang des Gradienten genutzt werden kann (Abb. 3b).

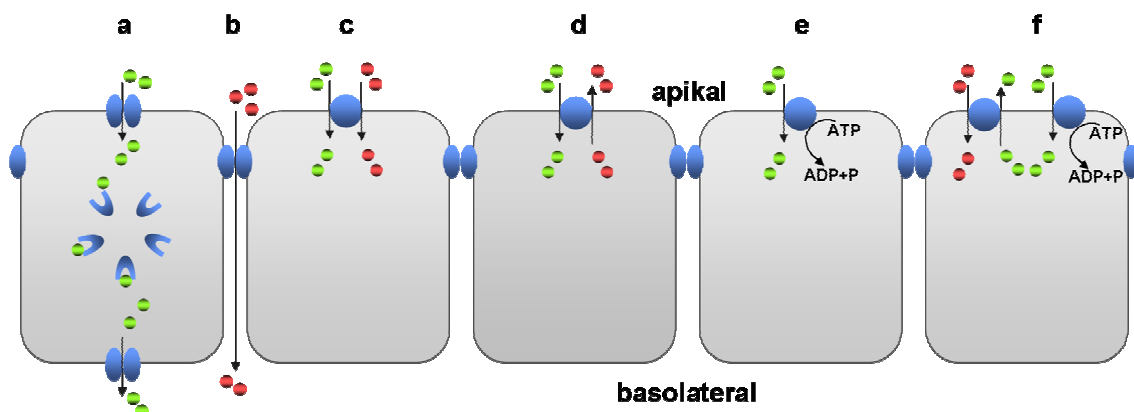


Abb. 3: Epitheliale Transportvorgänge sowie verschiedene Transportsysteme.

(a) Transzellulärer Transport über Kanäle und intrazelluläre Transporter, (b) parazellulärer Transport, (c) Symport zweier verschiedener Substanzen, (d) Antiport zweier verschiedener Substanzen, (e) primär aktiver Transport, (f) sekundär aktiver Transport

Maßgeblich regulierendes Element für diesen Transportweg ist ein Proteinkomplex im interzellulären Spalt, die Tight Junction.

1.3 Die Tight Junction

Die Tight Junction (TJ, lateinisch: *zonula occludens*, deutsch: Schlussleisten) ist eine Struktureinheit zwischen zwei benachbarten Epithelzellen, bestehend aus unterschiedlichen Transmembranproteinen sowie intrazellulären Adaptoren. Tight Junctions sind in allen epithelialen und endothelialen Geweben vorzufinden. Sie befinden sich am interzellulären Spalt, nahe der apikalen Seite von Zellschichten und umspannen die einzelnen Zellen vollständig. Diese Anordnung vermittelt epitheliale Gewebe bestimmte Eigenschaften (Abb. 4):

(i) Durch die Verankerung in der Plasmamembran wird verhindert, dass sich Transmembrankomponenten der apikalen und basolateralen Seite durch Diffusion durchmischen. Durch diese so genannte Zaunfunktion (*fence function*) erfüllt die Tight Junction eine wichtige Aufgabe für den Erhalt der Zellpolarität.

(ii) Durch Zell-Zell-Kontakte wird ein Abschluss gebildet, welcher die Diffusion von gelösten Substanzen durch den interzellulären Spalt reguliert: Für eine Vielzahl an Ionen und Molekülen ist keine Passage möglich, die Tight Junction übt eine Barrierefunktion aus (*barrier function*). Für bestimmte Ionen hingegen ist die Tight Junction permeabel und es kann eine distinkte Diffusion von Ionenspezies beobachtet werden (*channel / gate function*) [Diamond, 1977].

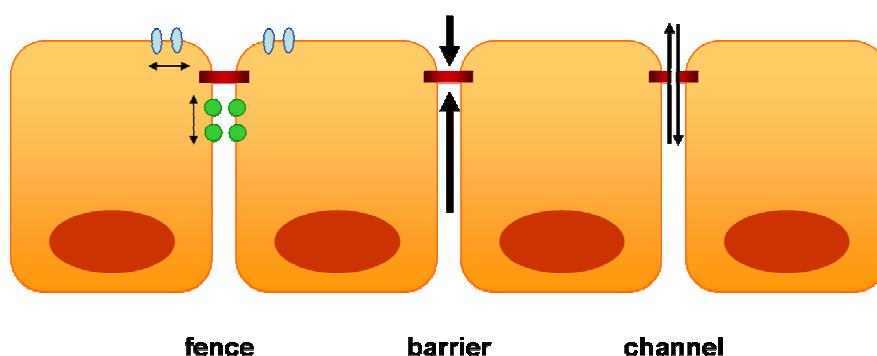


Abb. 4: Funktionen der Tight Junction.

Abgebildet sind die Aufgaben der Tight Junction in epithelialen Verbänden: Integrität (*fence*), Abschluss (*barrier*) und selektive Permeabilität (*channel*). (Nach Will *et al.*, 2008)

Die molekulare Zusammensetzung der Tight Junction wurde in den letzten Jahrzehnten erforscht und sukzessive sind unterschiedliche Komponenten identifiziert und charakterisiert worden. Als erste Transmembrankomponente wurde 1993 von der Arbeitsgruppe um Shoichiro Tsukita das Protein Occludin beschrieben, von dem inzwischen vier Spleißvarianten bekannt sind [Furuse *et al.*, 1993 ; Mankertz *et al.*, 2002]. Es ist

mit vier Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert und vermittelt Interaktionen des Tight Junction-Komplexes mit dem Zytoskelett. Dies geschieht über andere Tight Junction-Komponenten wie z.B. intrazelluläre Adaptoren der Zonula Occludens-Familie (ZO).

Weitere Transmembranproteine des Tight Junction-Komplexes sind in der Familie der *Junctional Adhesion Molecules* (JAM) zu finden. Diese Proteine weisen eine einzelne Transmembrandomäne sowie zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen auf und sind bisher vor allem im Zusammenhang mit Tight Junction-Assemblierung beschrieben worden [Bazzoni, 2003].

Anfangs wählte man Occludin als eine Schlüsselkomponente für die Barrierefunktion der Tight Junctions. Die Erstellung eines Occludin-defizienten Mausmodells offenbarte einen komplexen Phänotyp mit unterschiedlichen Organfehlfunktionen, jedoch einer Ausbildung von morphologisch unauffälligen Tight Junctions [Saitou et al., 2000]. Funktionelle Analysen an Gewebepreparationen dieser Mäuse wiesen keine Veränderungen hinsichtlich der Barrierewirkung auf [Schulzke et al., 2005]. Parallel zu den ersten Forschungsergebnissen wurden weitere Komponenten der Tight Junction entschlüsselt, die auch als membranständige Proteine mit vier Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Entsprechend ihrer Funktion als Tight Junction-abdichtende Proteine wurden sie als Claudin-1 und -2 (lat.: claudere = schließen) benannt [Furuse et al., 1998]. Weitere Claudine wurden zwischenzeitlich identifiziert und dieser Familie zugeordnet.

1.4 Die Claudin-Familie

Bis dato sind in Säugetieren 24 Mitglieder der Claudin-Familie beschrieben worden. Sie zeichnen sich durch ihre Strukturhomologie als Transmembranproteine mit vier Transmembranhelices, zwei extrazellulären Schleifen (*loops*), einer intrazellulären Schleife und cytosolischen N- und C- Termini aus (Abb. 5). Nahezu alle Claudine besitzen eine PDZ-Domäne im C-Terminus, wodurch eine Interaktion mit ZO-1 oder anderen Adaptorproteinen vermittelt wird und damit die Verankerung am Zytoskelett gewährleistet wird.

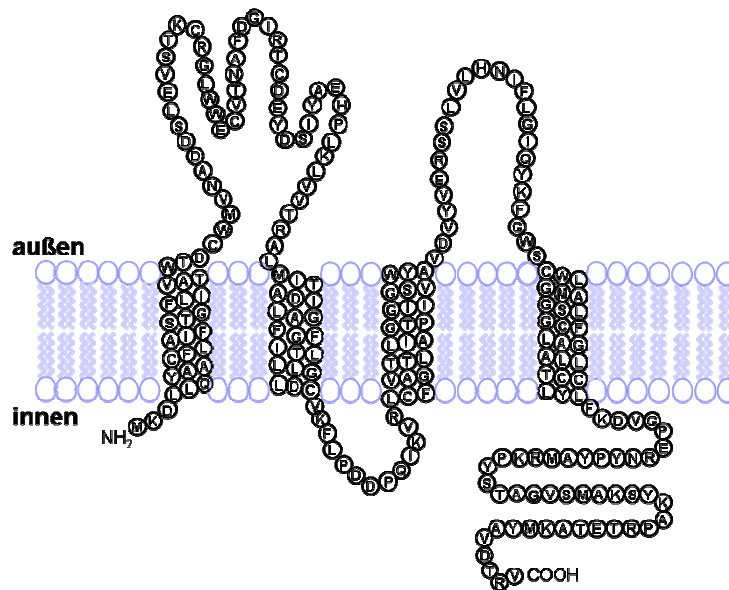


Abb. 5: Vorhergesagte Topologie des Claudin-16.

Abgebildet ist die Sequenz und postulierte Struktur des murinen Claudin-16-Proteins. Charakteristisch für Mitglieder der Claudin-Familie ist ein kurzer intrazellulärer N-Terminus, die Ausbildung einer großen ersten und einer kleineren zweiten extrazellulären Domäne. (nach Kausalya *et al.*, 2006)

Claudine besitzen eine molekulare Größe von 20-27 kDa. Sie sind evolutionär konserviert und in den Tight Junctions von unterschiedlichsten Vertebraten nachzuweisen; selbst in Fruchtfliegen und Fadenwürmern sind Claudine in Tight Junction-ähnlichen Strukturen, den *septate junctions*, nachgewiesen worden [Furuse und Tsukita, 2006]. Auf DNA- und Proteinebene erweisen sich die Claudine als nicht sehr stark homolog, mit der stärksten Konservierung in einigen Regionen der extrazellulären Schleifen, und der höchsten Variabilität im C-Terminus. Auf Grundlage der Primärstruktur haben Krause *et al.* kürzlich einen evolutionären Stammbaum der Genfamilie erstellt und die Mitglieder in zwei Hauptgruppen als klassische sowie nichtklassische Claudine unterteilt [Krause *et al.*, 2008].

Funktionell wird den Claudinen als Hauptaufgabe die Ausbildung der parazellulären Tight Junction-Barriere zugeordnet und damit die Schlüsselstellung hinsichtlich der Permeabilität einzelner Epithelien. Praktisch geschieht dies durch Ausbildung von Claudin-Claudin-Assoziaten, welche in Form von mehreren übereinander angeordneten Strängen epitheliale Zellen umschließen und somit eine Kompartimentierung gewährleisten. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gewebe-Gefrierbruchpräparationen sind Tight Junction-Stränge visualisierbar. Als wichtige Komponente am Kontaktpunkt dreier benachbarter Zellen wurde zudem das Protein Tricellulin beschrieben [Ikenouchi *et al.*, 2005]. Seine funktionelle Charakterisierung deutete u.a. auf eine wichtige Rolle hinsichtlich der Barrierefunktion für Makromoleküle in der trizellulären Tight Junction hin [Krug *et al.*, 2009].

Die einzelnen Familienmitglieder weisen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften auf. Einige Claudin-Subtypen, wie z.B. Claudin-4 oder -8, sind hauptsächlich in undurchlässigen Epithelien nachweisbar, etwa dem Blasenepithel, wo sie für einen dichten Gewebeabschluss sorgen [Acharya et al., 2004]. Eine abdichtende Funktion konnte auch für Claudin-3 und Claudin-5 beschrieben werden [Amasheh et al., 2005 ; Milatz et al., 2010]. Andere Claudinspezies, wie z.B. Claudin-2, finden sich in durchlässigen Epithelien wie den proximalen Nephronsegmenten [Enck et al., 2001] oder dem Oberflächenepithel von Duodenum, Ileum und Jejunum [Markov et al., 2010]. Funktionell wurde Claudin-2 als Kationenpore charakterisiert [Amasheh et al., 2002]. Im Einklang damit wurde für Claudin-2 eine Rolle in der parazellulären Kalziumabsorption im Darm postuliert [Fujita et al., 2008]. Eine neuere Studie wies Claudin-2-Poren zudem eine Permeabilität für Wassermoleküle zu [Rosenthal et al., 2010] und verdeutlichte die physiologische Relevanz der Tight Junction für die Wasser-Rückgewinnung in Gewebeabschnitten wie dem proximalen Tubulus. Ein Beispiel für das Zusammenspiel der Eigenschaften eines Epithels und dem Claudin-Expressionsprofil bietet das Nierentubulussystem mit dem anschließenden Exkretionssystem. Mit steigender Abdichtung des parazellulären Transportweges für Resorptionsprozesse wandelt sich das Expressionsmuster und spiegelt somit die Funktionalität der Claudin-Subtypen wider (Abb. 6).

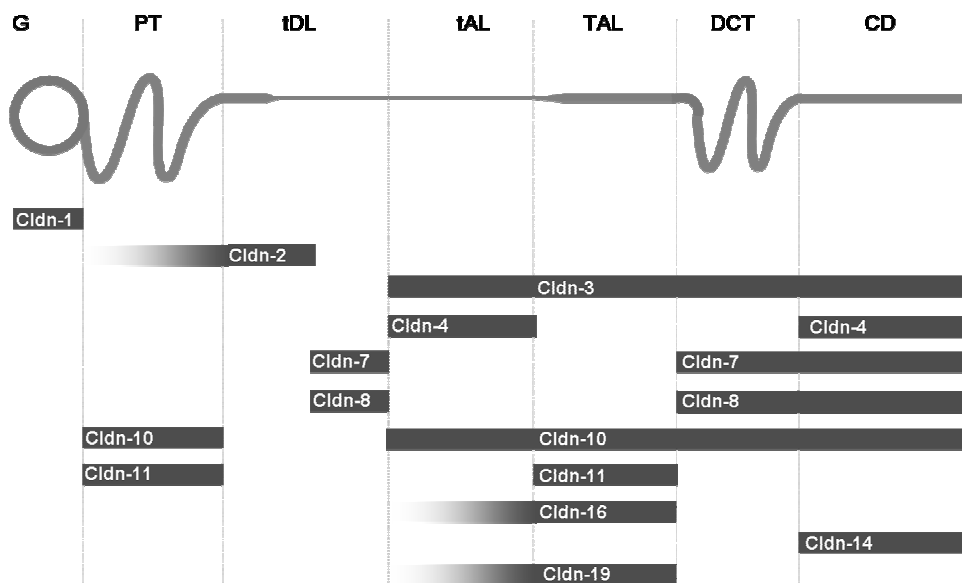


Abb. 6: Claudin-Expressionsmuster entlang des murinen Nephrons.

Horizontal gestreckte Darstellung eines Nephrons. In den proximalen Abschnitten des Tubulussystems mit hohen Resorptionsraten finden sich hauptsächlich porenformende Claudine, wie z.B. Claudin-2. Im distalen Nephron sind vorwiegend abdichtende Claudine, wie z.B. Claudin-4 und -8, exprimiert, und sorgen für einen epithelialen Abschluss zur Unterbindung von Diffusionsprozessen. Entnommen Will et al., 2008. G = Glomerulus, PT = proximaler Tubulus, tDL = dünner absteigender Ast, tAL = dünner aufsteigender Ast, TAL = dicker aufsteigender Ast, DCT = distales Konvolut, CD = Sammelrohr

Regulatorische Mechanismen der Claudine sind bis dato in Ansätzen geklärt. Auf Expressionsebene wurden Transkriptionsfaktoren wie Snail [Ikenouchi et al., 2003] und GATA-4 als spezifische Regulatoren für einige Claudin-Spezies bestätigt. Auch sind Einflüsse von Cytokinen und hormonellen Faktoren auf die Expression einzelner Subtypen in Zellkulturmodellen beschrieben worden. In Tumorgenese Prozessen, wo gewebe morphologische Änderungen oft mit einer Umstrukturierung epithelial assoziierter Zellschichten einhergehen, spielt die differenzielle Expression der Claudine mittlerweile eine wichtige Rolle in der Erforschung und Diagnostik [Ouban und Ahmed, 2010]. Ein Großteil der Claudine ist posttranslational (= auf Proteinebene) reguliert. Ein sehr gängiger Mechanismus ist die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von cytosolischen Serin- oder Threoninresten, wodurch entweder die Verankerung des Claudins in der Membran vermittelt wird, oder das Entfernen aus der Tight Junction durch Endozytose. Exemplarisch sei Claudin-16 angeführt, welches eine Rolle in der renalen Magnesiumresorption spielt (siehe Abschnitt 1.5) und dessen posttranslationale Regulation ausführlich von Ikari und Mitarbeitern erforscht wurde: Durch *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte eine Involvierung des cAMP/PKA (Proteinkinase A) -Signalweges in der Claudin-16-Regulation nachgewiesen werden, in dem Proteinkinase A über Phosphorylierung des Serinrestes 217 zum korrekten Einbau in der Plasmamembran beiträgt [Ikari et al., 2008a ; Ikari et al., 2006a ; Ikari et al., 2006b]. Der CaSR (*Calcium Sensing Receptor*), ein u.a. renal exprimierter Sensor und Regulator der Homöostase bivalenter Kationen, wurde als möglicher Modulator des genannten Signalweges beschrieben [Ikari et al., 2008b]. Dies würde den physiologischen Zusammenhang zwischen dem Grad der Supplementation und Resorption von Magnesium *in vivo* verdeutlichen: Ein Überschuss des Kations führt zur CaSR-Aktivierung und somit zur signalwegvermittelten Dislokation von Claudin-16 aus der Tight Junction, um die renale Resorption zu limitieren. Kürzlich wurde mit dem MEK/ERK-Signalweg ein weiterer Modulator der korrekten Zielfindung des Claudin-16 in der Zelle gefunden, welcher über Phosphorylierung C-terminaler Threoninreste die Lokalisation von Claudin determiniert [Ikari et al., 2009]; das Vorhandensein dieses zusätzlichen Regulationsweges unterstreicht somit die Dynamik des Tight Junction-Komplexes.

1.5 Claudin-16

Humanes *CLDN16* wurde erstmalig 1999 von Simon et al. im Zusammenhang mit Punktmutationen in humanen Genen beschrieben, die dem renalen Salzverlustsyndrom „Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose“ (FHHNC, OMIM 248250) zugrunde liegen [Simon et al., 1999]. Zunächst unter dem Namen Paracellin geführt, wurde dieses Gen anschließend in die Familie der Claudine eingeord-

net. FHHNC wird autosomal rezessiv vererbt. Betroffene Patienten werden meist in den ersten Lebensjahren klinisch auffällig, in der Regel mit rezidiven Harnwegsinfekten, Nierensteinen, oder Symptomen einer terminalen Niereninsuffizienz [Kari et al., 2003 ; Praga et al., 1995].

Ergebnisse aus Elektrophysiologische Untersuchungen mit *Cldn16*-transfizierten MDCK-Zellen konnten Claudin-16 als porenformendes kationenselektives Claudin einordnen [Kausalya et al., 2006]. Obwohl in funktionellem Zusammenhang mit Magnesiumresorption beschrieben, wird die Spezifität für einzelne Kationenspezies kontrovers diskutiert (siehe auch 1.7). Mit Ausnahme von Nachweisen in humanen Speicheldrüsen- und murinen Brustdrüsenproben [Kriegs et al., 2007 ; Markov et al., 2006], ist Claudin-16 in allen bisher untersuchten Spezies als ausschließlich renal exprimiert beschrieben worden. Entlang des Tubulussystems konnte Claudin-16 im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife nachgewiesen werden, einige Veröffentlichungen berichten auch von einer geringen Expression in den anliegenden Tubulusabschnitten, dem dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife [Angelow et al., 2007], und dem frühen distalen Tubulussystem [Konrad et al., 2006 ; Simon et al., 1999]. Aufgrund dieser spezifischen Lokalisation lässt sich der Phänotyp von Patienten mit Punktmutationen im Gen erklären: Im TAL findet, bedingt durch den hohen elektrochemischen Gradienten, ein Großteil der Ionenresorption parazellulär statt, insbesondere für Magnesium, aber auch für Kalzium (siehe auch Abb. 2). Ein nicht- bzw. teilfunktionelles Claudin-16 könnte somit zur unvollständigen Ausbildung der parazellulären Pore beitragen und somit die Resorption von zweiwertigen Kationen minimieren. Eine Folge des verstärkten renalen Verlustes dieser Ionenspezies ist die verminderte Verfügbarkeit im Körper - messbar als erniedrigter Serumspiegel. Eine erhöhte luminale Akkumulation von Kalzium gilt zudem als Risikofaktor für die Ausbildung von Nierensteinen [Sayer und Simmons, 2002], infolgedessen es zur Niereninsuffizienz kommen kann. Für Claudin-16-Mutationen im cytosolischen C-Terminus wurde zudem eine andere Funktionsstörung beschrieben: Durch fehlerhaftes Verankern mit intrazellulären Adaptoren unterliegen solche Mutanten einer schnellen Internalisierung durch Endozytose [Müller et al., 2003]. Die Anwendung von Endozytoseblockern könnte somit einen interessanten Ansatz darstellen, den Verbleib von fehlerhaftem Claudin-16 in der Plasmamembran zu fördern [Müller et al., 2006a ; Müller et al., 2006b]. Diese Studien verdeutlichen zudem, dass der Tight Junction-Komplex nicht als starres Gebilde zu verstehend ist, sondern einem ständigen *turnover* der Komponenten unterliegt.

Neben dem oben aufgeführten Krankheitsbild beim Menschen, wurde außerdem beim japanischen Schwarzrind dysfunktionales Claudin-16 beschrieben. Die Rinderkrankheit CINF (*bovine chronic interstitial nephritis with diffuse zonal fibrosis*) wurde mit dieser

Gendefizienz assoziiert und geht hauptsächlich mit tubulären Dysplasien, sowie Auffälligkeiten hinsichtlich der renalen Morphologie einher [Ohba et al., 2000 ; Okada et al., 2005]. Der kausale Zusammenhang zwischen Claudin-16-Defizienz und renalen Dysplasien wurde jedoch in einer neueren Studie angezweifelt [Sugiyama et al., 2007].

1.6 Claudin-10

Neben dem beschriebenen Claudin-16 sind weitere Claudinspezies im TAL exprimiert, von denen erwartet wird, dass sie eine Aufgabe in der Porenbildung dieses Segments, und somit im parazellulären Transport von Ionen erfüllen. Einen stark exprimierten Vertreter stellt Claudin-10 dar. Es ist, im Gegensatz zu Claudin-16, in den meisten Körpergeweben vorzufinden. Höchste Expressionsraten lassen sich in Niere, Darm, Pankreas, Lunge, Urogenitaltrakt und einzelnen Gehirnarealen nachweisen, in den übrigen Organen ist die Expression geringer (Abb. 7, 8). Einen zusätzlichen Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten daher Untersuchungen zur Funktion von Claudin-10, insbesondere in der renalen Ionenhomöostase. Von Claudin-10 ließen sich in den vergangenen Jahren zwei verschiedene Isoformen [Van Itallie et al., 2006] sowie unterschiedliche Spleißvarianten [Günzel et al., 2009] nachweisen, welche *in vitro* unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen: *Cldn10b*, die prädominierende Isoform, zeigt eine ubiquitäre Verteilung in epithelialem Gewebe, und wurde in der Niere vorzugsweise in den distalen Tubulussegmenten nachgewiesen. Anhand von Transfektionsstudien wurde Claudin-10b als Kationenpore identifiziert. Die Expression der anderen Isoform, *Cldn10a*, beschränkt sich auf Uterus und Niere, in letzterem Organ hauptsächlich auf das proximale Nephron. Funktionell wurde Claudin-10a mit anionenspezifischer Porenfunktion beschrieben [Günzel et al., 2009 ; Van Itallie et al., 2006] (Abb. 8).

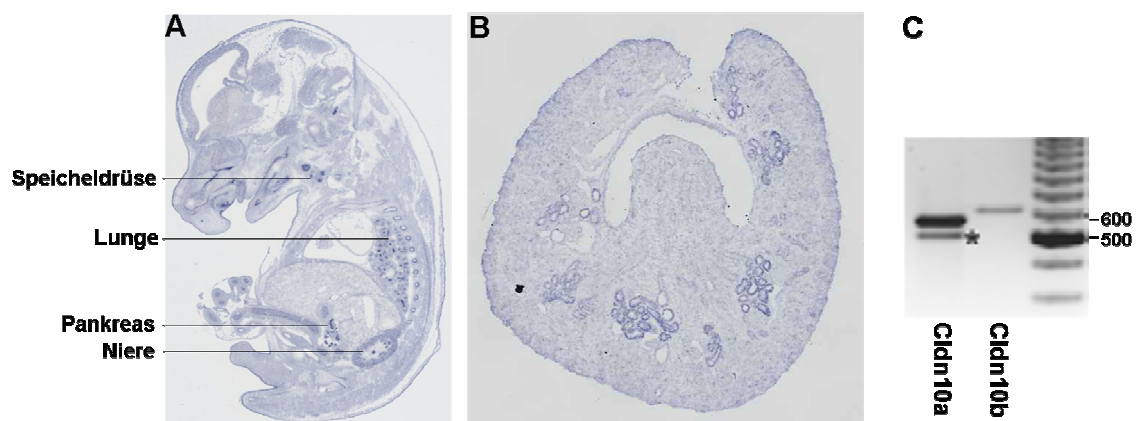


Abb. 7: *Cldn10*-Expression in murinem Gewebe.

Dargestellt sind in situ-Hybridisierungsdaten (ISH) von *Cldn10b* in murinem embryonalem Gewebe (A, *whole mounts* E14.5), sowie von *Cldn10a* in adulten Nierenquerschnitten (B, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Gregor Eichele, MPI Göttingen). In der Gesamtnierenpräparation sind die beiden Hauptvarianten *Cldn10a* und *Cldn10b* ersichtlich, zudem ist eine Spleißvariante des *Cldn10a* markiert (C, nach Günzel et al., 2009)

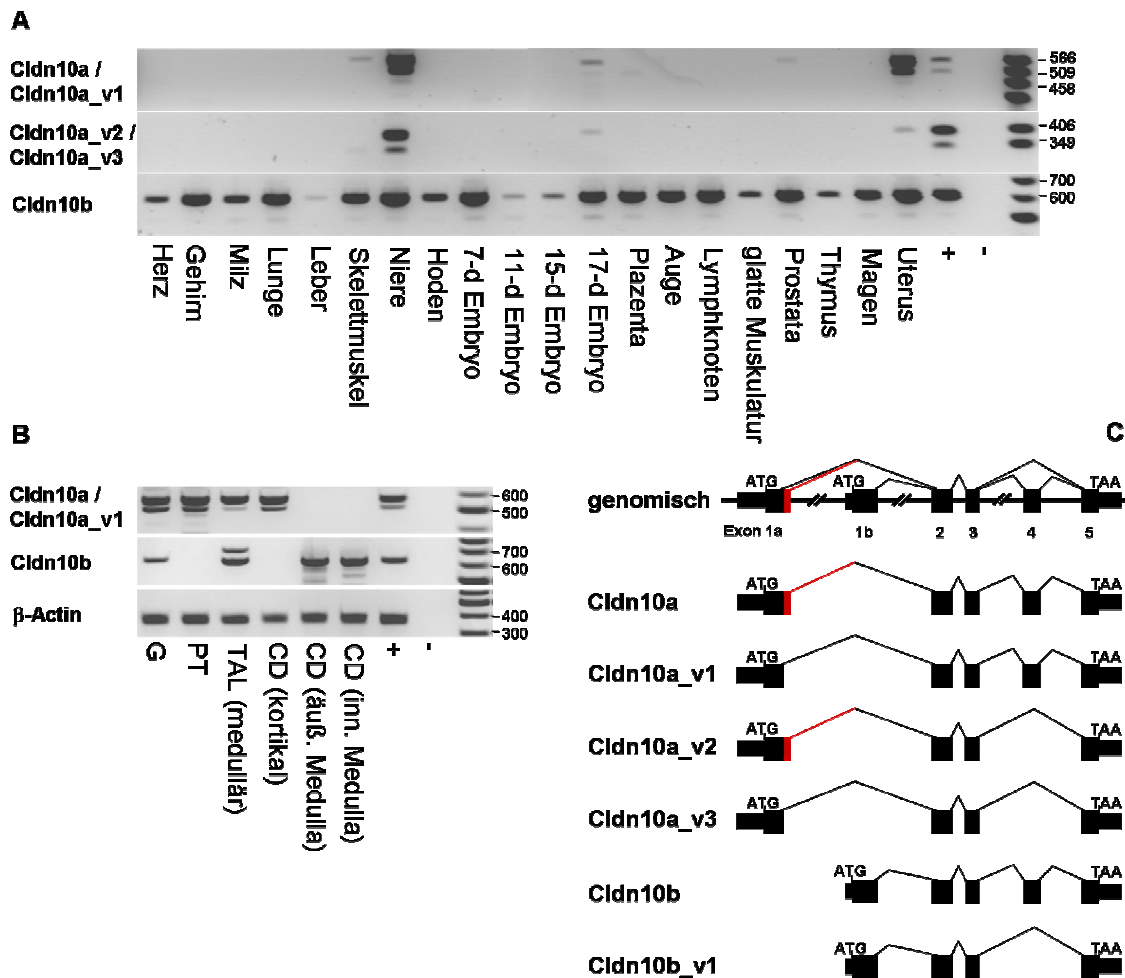


Abb. 8: Cldn10-Expressionsmuster.

Ersichtlich ist das Expressionsprofil der unterschiedlichen *Cldn10*-Varianten in verschiedenen Gewebe-Präparationen (A), sowie entlang ausgewählter Nierentubulusabschnitte (B). Die genomische Organisation am Genloкус inkl. aller *Cldn10*-Varianten ist in (C) abgebildet. Rote Verbindungslinien deuten das Vorliegen einer Spleiß-Donorsequenz für eine verkürzte Expression des Exons 1a an. Positivkontrolle (+), Wasserkontrolle (-). Modifiziert nach Günzel *et al.*, 2009.

Im Gegensatz zu den ausführlich beschriebenen *in vitro* - Eigenschaften ist die *in vivo* - Rolle von Claudin-10 bis dato nicht geklärt. Keine menschliche Erkrankung ist nach derzeitigem Wissensstand mit dysfunktionalem Claudin-10 assoziiert. Dennoch ist zu vermuten, dass die spezifische Expression in bestimmten Gewebeabschnitten mit einer distinkten physiologischen Aufgabe gekoppelt ist. Claudin-10b ist in der Niere hauptsächlich in solchen Tubulussegmenten zu finden, in welchen eine Rückgewinnung von Natrium stattfindet. Eine Fragestellung bestand daher darin, ob die Aufgabe von Claudin-10 in der Niere im Zusammenhang mit der NaCl-Homöostase zu finden ist. Als nachgelagerter Effekt der Natrium-Balance könnte Claudin-10 somit ebenfalls regulativ den Blutdruck bestimmen, sowie in Form von NaCl-assoziierten Osmoseprozessen den Wasserhaushalt des Körpers beeinflussen.

1.7 Claudine: Poren- und Barrierebildung

Zum genauen Verständnis der Struktur und Funktion einer Claudin-Pore sollen an dieser Stelle einige grundlegende Betrachtungen angestellt und Faktoren erörtert werden, welche die Durchlässigkeit einer epithelialen Zellschicht determinieren:

(i) Der Transepitheliale Widerstand (*transepithelial resistance*, TER) beschreibt die Durchlässigkeit eines Epithels für Ionen. Entsprechend der zwei Permeationswege durch epitheliale Schichten setzt er sich zusammen aus der Durchlässigkeit des parazellulären Transportweges durch die Tight Junction, und der Permeabilität des transzellulären Weges [Powell, 1981]. Eine mitunter kontrovers diskutierte Theorie besagt, dass der TER in der Anzahl von Tight Junction-Strängen begründet liegt: Mit zunehmender Strangzahl kommt es zu einer Abdichtung des parazellulären Spaltes und damit zu einer Erhöhung des Widerstandes einer Zellschicht [Claude, 1978]. Auch einzelnen Claudinen wird ein Einfluss auf den Widerstand eines Epithels zugesprochen; so sind etwa Claudin-1 oder Claudin-8 als abdichtend beschrieben worden [Angelow et al., 2007 ; Angelow und Yu, 2007 ; Inai et al., 1999 ; Yu et al., 2003]. Es wird postuliert, dass die Interaktion der extrazellulären Loops hierfür maßgeblich entscheidend ist.

(ii) Für den parazellulären Flux von Ionen und Soluten hat zum Einen die Größe, zum Anderen die Ladung einen Einfluss auf die Passierbarkeit der Tight Junction: Ungeladene organische Moleküle weisen größenabhängig eine unterschiedliche Diffusionsrate auf und deuten auf das Vorhandensein von distinkt unterschiedlich großen Poren mit verschiedenen Transportkapazitäten hin [Van Itallie et al., 2008]. Das Wissen um die selektive Permeabilität der Tight Junction für geladene Stoffe ist begründet auf thermodynamische Berechnungen von Eisenman. Ursprünglich auf die Bindungsstärke von Ionen an Glaselektroden bezogen, wurden seine Theorien auf biologische Systeme übertragen, etwa die Bindung von Ionen an Ionenkanälen. Für die Permeabilität von Tight Junctions wurden Interaktionsstärken Ion – Pore postuliert, infolgedessen Ionen in unterschiedlicher Präferenz (den so genannten Eisenman-Sequenzen) die Pore passieren – entweder unter Verlust oder Beibehalt der Hydrathülle [Eisenman, 1962].

Bezüglich der Topologie einer Pore geht man bislang davon aus, dass Claudine oligomerisieren und ihre extrazellulären Domänen gen Poreninnenraum ausrichten. In einer Studie wurde die Formierung von Claudin-Hexameren postuliert [Mitic et al., 2003].

Epitheliale Widerstände von Zellschichten als auch Ionenpermeabilitäten der Tight Junctions wurden zunächst an Geweben, später in Zellkulturen untersucht. Diese Systeme bieten die Möglichkeit, unter kontrollierten Bedingungen einzelne Versuchsgrößen zu analysieren. Um die Barriereigenschaften eines einzelnen Claudins zu untersuchen, bieten sich Transfektionsexperimente an. Hierbei wird die codierende DNA

des gewünschten Proteins in einzelne Zellen eingebracht, diese werden im Anschluss selektiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Das exprimierte Protein kann anschließend hinsichtlich seines Einflusses auf den epithelialen Widerstand und auf einzelne Ionen-permeabilitäten untersucht werden.

Eindeutige Hinweise hinsichtlich der Ionenspezifität einer Pore haben sich bisher aus der Nettoladung der extrazellulären Domänen ergeben: Eine überwiegende Bestückung mit positiv oder negativ geladenen Aminosäuren resultiert in Anionen- bzw. Kationenspezifität. *In vitro*-Studien anderer Arbeitsgruppen konnten ebendiesen Zusammenhang belegen, bzw. über gezielten Austausch positiv und negativ geladener Aminosäuren einen reversen Effekt beobachten [Colegio et al., 2003 ; Van Itallie et al., 2003]. Anschaulich ist auch das Beispiel des Claudin-10: Die zwei prädominierenden Isoformen des Claudin-10 unterscheiden sich im ersten Exon, welches überwiegend für die Proteinsequenz des ersten extrazellulären Loops codiert. Claudin-10a weist in dieser Domäne vorwiegend positive Ladungsträger auf und konnte in zellbiologischen Systemen als anionenspezifischer Porenbildner charakterisiert werden. Claudin-10b hingegen hat im ersten extrazellulären Loop eine negative Nettoladung und erwies sich *in vitro* als Kationenpore [Günzel et al., 2009] (Abb. 9).

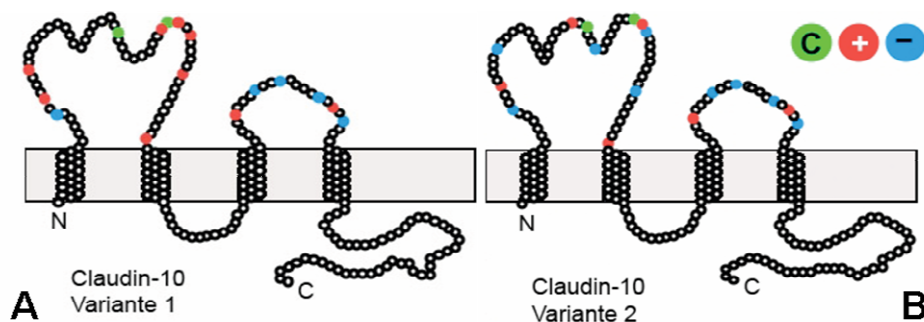


Abb. 9: Topologie der zwei Haupt-Varianten des Claudin-10.

Dargestellt ist die putative Topologie von Claudin-10a (A) und Claudin-10b (B). Konservierte Cysteinreste der ersten extrazellulären Domäne sind grün angezeigt, geladene Aminosäuren in rot (positiv) bzw. hellblau (negativ) dargestellt. (mit freundlicher Genehmigung von L. Haisch)

Am Beispiel des Claudin-16 verdeutliche ich nun, dass die Porenspezifität hinsichtlich distinkter Ionenspezies mitunter kontrovers diskutiert wird: Claudin-16 wurde *in vivo* als Magnesiumkanal postuliert [Simon et al., 1999]. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen an MDCK-Monolayer-Zellsystemen, in denen Claudin-16 als magnesiumspezifische Pore beschrieben wurde [Kausalya et al., 2006]. Eine andere Studie berichtete hingegen in LLC-PK1-Monolayern eine selektive Präferenz für Natriumionen [Hou et al., 2005]. Da Claudin-16 vorwiegend im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert ist, wurde diese Präferenz folgendermaßen interpretiert: Entlang des TAL ändert sich der Konzentrationsgradient an gelöster Substanz zwischen Lumen und Interstitium. Durch die Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid, vermittelt durch den apikal

lokalisierten Transporter NKCC2, wird das Interstitium zunehmend hyperosmotisch. Ein Großteil der Kaliumionen wird über ROMK, einen luminalen Transporter, zurück in den Tubulus transportiert und resultiert in einem positiven luminalen Potential. Claudin-16 fungiert zudem als Kationenpore und bewirkt einen selektiven Einstrom von einem Teil des resorbierten Natriums zurück ins Tubuluslumen, unter Verbleib von Chlorid im Interstitium. Das positive Potential wird dadurch verstärkt (+ 30 mV) und dient als Triebkraft für die passive Resorption von Magnesium. Beim Fehlen von Claudin-16 ist dieses System gestört: Die Diffusion von Natrium ins Lumen unterbleibt, die Spannungsdifferenz am Tubulusepithel ist verkleinert, und die Ausbildung der Triebkraft für den Magnesiumflux dadurch reduziert [Hou et al., 2005].

Eine weitere Fragestellung hinsichtlich der Spezifität von Claudinen ergibt sich in deren Zusammensetzung bei der Porenbildung: Welche Claudin-Subtypen haben eine synergistische Wirkung, und sind manche Kombinationen aus Claudinen undenkbar?

Es ist bekannt, dass Claudine als Heteropolymere in der Plasmamembran assemblieren, d.h. dass einzelne Claudin-Stränge aus unterschiedlichen Subtypen zusammengesetzt sein können. Neben dieser so genannten Cis-Interaktion beschreibt die Trans-Interaktion Claudin-Claudin-Wechselwirkungen zwischen Strängen von benachbarten Zellen über nichtkovalente Loop-Loop-Interaktion. Und auch hier sind sowohl homophile als auch heterophile Wechselwirkungen beschrieben worden, d.h. es sind Interaktionen zwischen ein und demselben Subtyp denkbar, sowie Kombinationen aus unterschiedlichen Claudinen (Abb. 10).

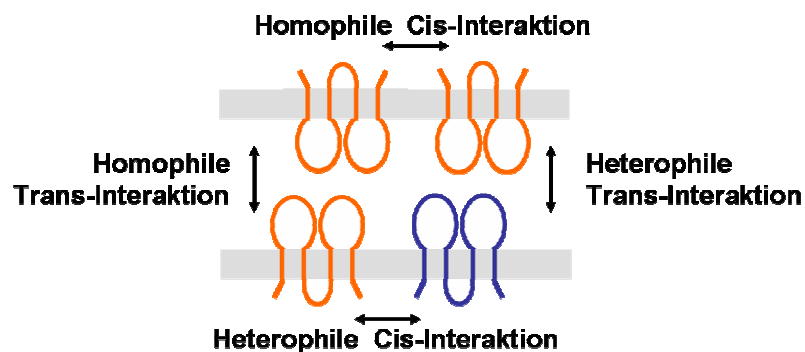


Abb. 10: Claudin-Claudin-Interaktionen.

Dargestellt sind zwei unterschiedliche Claudin-Spezies (orange, blau; vereinfachte Darstellung) und deren Interaktionsmöglichkeiten (Doppelpfeile): In der Plasmamembran (grau) im Rahmen der Strangbildung (Cis-Interaktion) und zwischen benachbarten Zellen über Wechselwirkung der extrazellulären *loops* (Trans-Interaktion).

Sowohl für die Cis- als auch die Trans-Interaktion sind bestimmte Subtyp-Varianten möglich, während andere sich ausschließen. Beispielsweise assemblieren Claudin-1 und 2, welche sehr unterschiedliche Abdichtungsfunktion haben, nicht zu Claudinständen, aber Assoziante aus Claudin-3 und -1 bzw. -2 wurden beschrieben [Furuse et al., 1999]. Ähnliche Limitierungen gelten auch für Wechselwirkungen der extrazellulären

Domänen. Beispielsweise konnten keine Interaktion von Claudin-3 und -4 beobachtet werden [Daugherty et al., 2007].

1.8 Knockout-Mäuse: Grundlagen und Anwendung in der Funktionsaufklärung von Claudinen

Da die einzelnen Claudin-Spezies solch unterschiedliche Funktionalität, Häufigkeit und Gewebeverteilung aufweisen, ist zu erwarten, dass eine Malfunktion einzelner Proteinfamilienmitglieder unterschiedliche Auswirkungen im Organismus haben kann. Verschiedene menschliche Erkrankungen sind mit der fehlerhaften Expression eines bestimmten Claudins assoziiert. Da monogenen Ursprungs, bietet sich die Erforschung dieser Fehlfunktion durch die Erstellung eines Tiermodells an, welches die gleiche Proteindefizienz aufweist. Praktisch geschieht dies in der Regel durch das Generieren eines Mausmodells mit gerichteter Gendeletion (Knockout-Maus). Die genetische Manipulation erfolgt klassischerweise durch Inaktivierung des Zielgens auf Keimbahnebene im Rahmen eines gerichteten Gentergetings. Hierzu wird auf Ebene embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) durch homologen Austausch am Locus ein mutiertes Gen eingebracht. Korrekt getargetete ES-Zellen dienen als Grundlage für die Generierung einer transgenen Mauslinie, welche die genetische Veränderung aufweist (Abb. 11). In der Knockout-Maus wird somit gezielt die Expression eines Proteins durch Manipulation am Genlocus unterbunden.

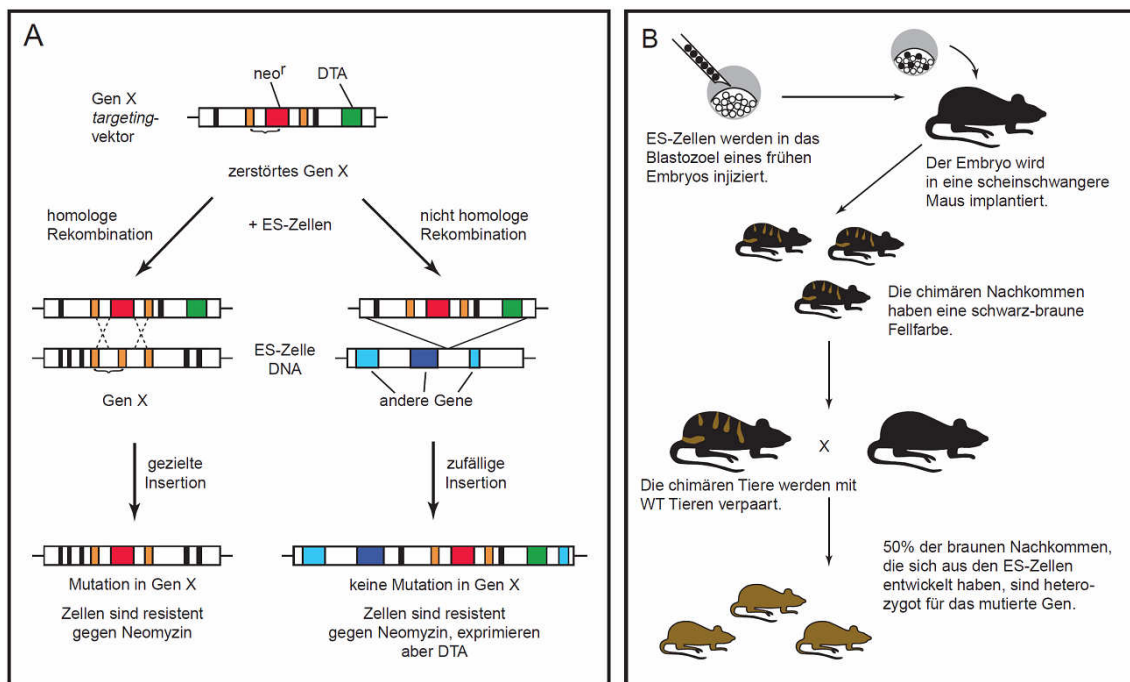


Abb. 11: Übersichtsschema zur Strategie des Gen-Knockouts in Mäusen.

Dargestellt sind (A) das Gentergeting zur Manipulation des Locus in embryonalen Stammzellen sowie (B) deren Injektion in Blastozysten zur Generierung einer gendefizienten Mauslinie (nach Lodish *et al.*, 1995, modifiziert von T. Breiderhoff).

Erstmalig wurde dieses Verfahren der Generierung transgener Mäuse 1987 von Cappechi und Kollegen am Beispiel des HPRT- Gens beschrieben [Thomas und Cappechi, 1987] und anhand weiterer Gene der Embryonalentwicklung weiter evaluiert [Capechi, 1989]. Innerhalb von 20 Jahren sind schätzungsweise gut 9000 Mausdefizienzmodelle erstellt worden [Collins et al., 2007], sehr häufig wurden dabei solche Gene ausgeschaltet, welchen in Stoffwechselprozessen eine Schlüsselfunktion zukommt, oder deren Fehlfunktion mit einer bereits beschriebenen humanen Erkrankung in Verbindung gebracht wurde.

Das herkömmliche Verfahren der Generierung ist die konventionelle Knockoutstrategie, bei welcher das Gen unwiderruflich durch Manipulation zerstört wird. Die Terminologie beschreibt ein intaktes Allel mit einem „+“, ein deletiertes Allel mit einem „-“ -Symbol; z.B. würde eine *Cldn16* heterozygote Maus demnach mit *Cldn16*^{+/-} bezeichnet. Alternativ dazu werden heutzutage viele Tiermodelle nach der konditionellen Strategie erstellt, bei welcher das Gen vorerst normal exprimiert werden kann, jedoch in einem nachgelagerten Schritt „ausgeschaltet“ wird. Hierbei wird in der Regel die Cre / lox-Technologie angewendet, ein Rekombinationssystem bestehend aus Exzisionssequenzen (loxP / lox) und dem dazugehörigen Rekombinationsenzym Cre-Rekombinase [Sauer und Henderson, 1988]. Dieses Enzym katalysiert ein Genomrearrangement zwischen zwei gleich orientierten lox-Sequenzen durch Deletion des dazwischen liegenden DNA-Abschnittes (Abb.12 A). Dieses System bietet die Möglichkeit, den zu deletierenden Genomabschnitt im Rahmen des Gentargetings mit Exzisionssequenzen zu flankieren, wodurch eine Expression des so genannten gefloxtes Abschnittes vorerst nicht unterbunden wird. Erst in einem nachfolgenden Schritt - durch Zugabe des Cre-Enzyms - wird der gefloxtes DNA-Abschnitt und somit die codierende Sequenz deletiert.

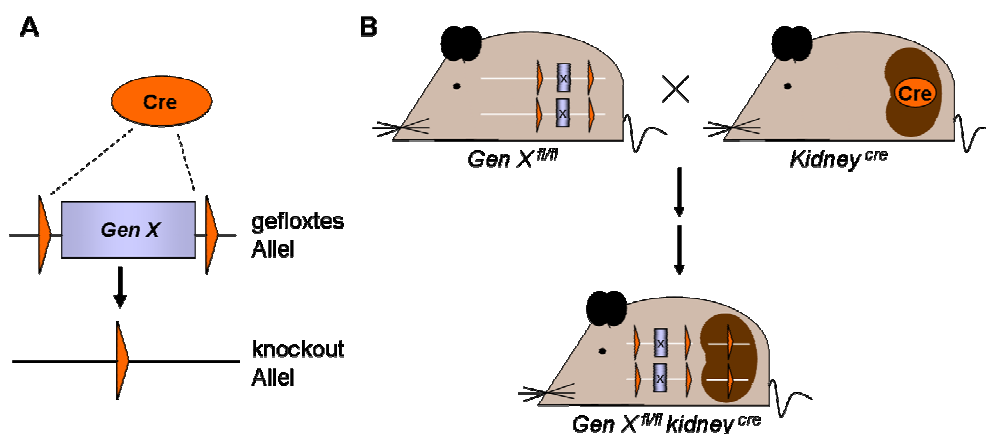


Abb. 12: Wirkungsweise des Cre / lox-Systems.

Exzision von loxP-flankierten (= gefloxtes) DNA-Abschnitten (A), sowie der Einsatz *in vivo* zur Generierung organspezifischer Gendefizienzen (B, verkürzte Darstellung der Zuchtschritte).

Analog zur Cre / lox-Technologie kommt auch das FLP / FRT-System zum Einsatz, bei welchem eine durch das Rekombinationsenzym FLP vermittelte Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen erfolgt [Gates und Cox, 1988]. Die Cre / lox- und die FLP / FRT -Technologie ermöglichen fortführende Untersuchungen der Gendefizienz, etwa durch gewebespezifische Gendeletion, oder in Form eines ontogenetischen Ansatzes, wo die Defizienz eines Gens zu unterschiedlichen prä- oder postnatalen Entwicklungsstadien hervorgerufen wird [Kohan, 2008 ; Wu, 2007].

In der Regel wird mit doppelt transgenen Tierstämmen gearbeitet. Hierbei wird das Rekombinationsenzym Cre von einem ersten (transgenen) Mausstamm etwa ubiquitär, gewebe- oder entwicklungsspezifisch exprimiert. Das Einkreuzen dieses transgenen Mausstamms in eine zweite, konditionelle Mauslinie (mit gefloxtem Locus am Zielgen) bietet die Grundlage für die Generierung eines Total-Knockouts, für organspezifische, oder entwicklungsspezifische Defizienzanalysen (Abb. 12 B, siehe auch Abb. 30).

Die gezielte Expression eines solchen Transgens, etwa besagtes Cre-Rekombinationsenzym, kann auf zweierlei Weise erfolgen: (i) Durch Integration der Cre-codierenden Gensequenz inkl. geeignetem Promotor an einer randomisierten Stelle im Genom, oder (ii) durch gerichteten Einbau (Knock-In) der Gensequenz an einem Zielgen, unter Ausnutzung der Promotorspezifität dieses Gens. Die Terminologie dieser transgenen Stämme bezeichnet in Fall (i) zusätzlich den Promotor (etwa CMV-Cre), in Fall (ii) den Genort des Knock-Ins (etwa *Cldn16^{Cre}*).

Abgewandelte Verfahren des gezielten Genausschaltens kommen z.B. in der Erstellung von so genannten Knockdown-Mäusen (KD) zum Einsatz. Hierbei bleibt das Gen intakt, die Expression des Proteins wird aber auf Translationsebene unterbunden oder stark reduziert. Ein weit verbreiteter Ansatz ist die siRNA-Technologie (*small interfering RNA*). Durch Interaktion interferierender RNA mit dem Translationskomplex wird die Degradation zu translatierender mRNA katalysiert. Diese interferierende RNA kann direkt in das gewünschte Zielgewebe durch Injektion appliziert werden [Lewis und Wolff, 2005]. Alternativ kann eine Transkriptionskassette zur Expression ins Genom eingebracht werden, welche aus promotorgesteuerter Nukleinsäuresequenz besteht und aus dieser Vorläuferform aktive siRNA generieren kann [Sandy et al., 2005].

Murine Claudin-Defizienzmodelle wurden relativ zeitnah mit der Entdeckung dieser Genfamilie erstellt, und erwiesen teilweise eine sehr ähnliche Funktionalität in Maus und Mensch:

(i) Claudin-1-defiziente Mäuse weisen einen Defekt in der Epidermis auf und versterben postnatal durch Austrocknung [Furuse et al., 2002]. Menschen mit Claudin-1-Defekt leiden an einer Erkrankung namens NISCH-Syndrom (*Neonatal Ichthyosis-Sclerosing Cholangitis Syndrome*), welche u.a. einen schweren Hautphänotyp mit Skle-

rotisierungsprozessen verursacht, jedoch nicht exakt durch den letalen Phänotyp des Tiermodells widergespiegelt wird [Hadj-Rabia et al., 2004].

(ii) Kongenitale Taubheit (DFNB9) ist eine humane Erkrankung basierend auf Claudin-14-Defizienz. Mit der Erstellung von *Cldn14*-Knockout-Mäusen konnte dieser Phänotyp reproduziert werden [Ben-Yosef et al., 2003]. Auf morphologischer Ebene wurde ein progressiver Verlust von äußeren Haarsinneszellen (*outer hair cells*, OHCs), den elektromechanischen Verstärkern akustischer Stimuli, beobachtet, wodurch letztendlich die Weiterleitung von Reizen verhindert wird. Die Ursache wurde in einer fehlerhaften Kompartimentierung der Innenohr-Areale vermutet, einhergehend mit einer veränderten Zusammensetzung der unterschiedlichen Lymphflüssigkeiten hinsichtlich der Elektrolyte. Die sukzessive Degradation der Haarsinneszellen wurde spekulativ einer toxischen Akkumulation von Kaliumionen in der Kortilymphe zugeordnet.

(iii) Das bereits in Abschnitt 1.5 aufgeführte Salzverlust-Syndrom bei dysfunktionalem Claudin-16 wurde durch ein kürzlich etabliertes *Cldn16*-Knockdown-Mausmodell weitestgehend widergespiegelt, wenn auch mit einer weniger starken Progression des Krankheitsbildes [Hou et al., 2007].

(iv) *CLDN19*-Mutationen führen beim Menschen - in Analogie zu *CLDN16*-Mutationen, zu FHHNC. Zusätzlich weisen die Betroffenen oft ein eingeschränktes Sehvermögen auf. Die entsprechende Mausmutante hingegen zeigte neurologische Defekte in Form von Bewegungsauffälligkeiten, morphologisch auffällig war eine unzureichend ausgebildete Tight Junction-Barriere der Schwannschen Zellen des peripheren Nervensystems [Miyamoto et al., 2005]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der unterschiedliche Phänotyp in Maus und Mensch aus einer noch nicht umfassenden Evaluation des Tiermodells resultiert. Diese Hypothese könnte gestützt werden von Beobachtungen in einem unabhängig generierten *Cldn19*-Knockdown-Tiermodell, welches sehr wohl einen renalen Phänotyp mit Verlust von Magnesium und Kalzium aufweist [Hou et al., 2009].

Anhand der beschriebenen Claudin-Defizienzmodelle wird ersichtlich, wie unterschiedlich sich der Phänotyp hinsichtlich Schweregrad und betroffenem Organsystem auswirkt. Dies demonstriert die essenzielle Rolle der Claudin-Familie für die Aufrechterhaltung der Epithelintegrität. Außerdem wird deutlich, welche unterschiedliche Funktionalität die einzelnen Claudin-Familienmitglieder aufweisen.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Beitrag zur Funktionsaufklärung von zwei Vertretern der Claudin-Familie, Claudin-16 und Claudin-10, zu leisten. Zum Einen stand das Aufklären von Mechanismen der Ionenresorption in der Niere im Vordergrund. Zum Anderen bestand ein klinisches Interesse darin, auf der Grundlage dieser Forschungsergebnisse geeignete Therapieansätze für Patienten mit renalem Salzverlust zu entwickeln.

Mutationen im menschlichen Gen *CLDN16* sind mit dem renalen Verlust von zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) assoziiert und manifestieren sich in der Erkrankung Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC). Diese Erkrankung führt bereits im Kindes- und Jugendalter zur terminalen Niereninsuffizienz. Claudin-10 ist ubiquitär in vielen Geweben nachzuweisen, besonders in Niere, Gehirn und Lunge, die genaue Funktion ist nicht geklärt. Die Expression entlang des Nierentubulus lässt eine Aufgabe in der renalen Ionenhomöostase vermuten.

Untersuchungen an Zellkultursystemen konnten zu einem besseren Verständnis der Barrierefunktion beider Claudine beitragen. Um eine detailliertere Einsicht in die *in vivo*-Rolle von Claudin-16 und Claudin-10 zu erhalten, sind jedoch komplexere Untersuchungssysteme nötig. Auf der Suche nach Therapieansätzen bei FHHNC waren innerhalb der Arbeitsgruppe Vorarbeiten geleistet worden. Ein pharmakologischer Untersuchungsansatz erwies sich *in vitro* bei mutiertem Claudin-16 als viel versprechend. Dieser Befund unterstreicht jedoch die Notwendigkeit für ein Tiermodell mit Claudin-16-Defizienz für fortführende Studien.

Um die physiologische Rolle beider Claudine aufzuklären, wurden folgende Aufgabenstellungen festgelegt:

- I. In einem ersten Schritt sollten Mäuse generiert werden, denen das jeweilige Gen fehlt. Hierbei kam die Cre-lox-Technologie zur Anwendung. Diese ermöglicht es, zunächst das Gen auf Keimbahnebene durch homologe Rekombination zu modifizieren. Im Anschluss können codierende Gensequenzen deletiert werden, um auf diese Weise die Expression des Proteins in der Maus zu unterbinden.
- II. Claudin-16-defiziente Mäuse sollten hinsichtlich ihres renalen Phänotyps charakterisiert werden. Neben der Untersuchung von Nierenfunktion und Nierenhistologie sollten Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, um regulatorische Mechanismen in renalem Gewebe aufzuzeigen.
- III. Claudin-10-defiziente Mäuse sollten einer Grundcharakterisierung unterzogen werden. Als Schwerpunkte wurden hierbei die Vitalität, die Morphologie und die Nierenfunktion gesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Tiere sollten als Grundlage für fortführende funktionelle Untersuchungen der Claudine-10 und -16 dienen, und damit langfristig zur Erarbeitung pharmakologischer Manipulationen und therapeutischer Interventionen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Standardchemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chemikalien wurden, sofern nicht abweichend angegeben, bei den Firmen Roth (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) in reinst oder p.A.-Qualität bestellt. Standard-Verbrauchsmaterialien wurden von den Charité-internen Lagerbeständen, oder der Firma Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Laborkleingeräte entstammten, falls nicht gesondert vermerkt, den Firmen Eppendorf (Hamburg, D), Hettich (Tuttlingen, D) und HLC (Bovenden, D).

3.1.2 Reagenzien für Molekularbiologie, Zellbiologie und Proteinchemie

Tab. 1: Verwendete Spezialreagenzien

Reagenz	Hersteller
Restriktionsenzyme Antarktische Phosphatase Nukleosidtriphosphate DNA-Polymerase "Taq Thermo"	NEB (Ipswich, MA, USA)
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
GeneRuler DNA-Größenstandard PageRuler Protein-Größenstandard	Fermentas (Ontario, CAN)
RNAse A Gelatine Ampicillin Mitomycin DMSO	Sigma-Aldrich, (Deisenhofen, D)
T4-DNA-Ligase 1 kb ladder DNA-Größenstandard Non Essential Amino Acids (NEAA) Fetales Kälberserum (FKS) Penicillin / Streptomycin L-Glutamin Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen (San Diego, CA, USA)
DNAse I DNA-Polymerase „Expand“ Proteinase K	Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)
DNA-Polymerase „Phusion High Fidelity“	Finnzymes (Espoo, FIN)
SDS (10%ige Lösung) Acrylamid TEMED	Biorad (Hercules, CA, USA)
APS	Merck (Darmstadt, D)

Tab. 2: Verwendete Plasmidvektoren und Klonierungs-Kits

Plasmid	Bezugsquelle / Verweis
pGEM T-Easy	pGEM T-Easy Vector System, Promega (Fitchburg, WI, USA)
pCR 2.1 TOPO	TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen (San Diego, CA, USA)
pGEM-DTA	AG Jentsch, FMP Berlin [Stobrawa et al., 2001]
pBSSK neoA3 lox	AG Gotthardt, MDC Berlin [Lisewski et al., 2008]
pTurboCre	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/12965137 , [Revell et al., 2005]

3.1.3 Puffer, Medien, Lösungen

Sämtliche Standardpuffer, -medien und -lösungen wurden, sofern nicht gesondert aufgelistet, nach Standardmethoden zubereitet [Sambrook und Russell, 2001], Selektionszusätze wurden in üblicher Konzentration eingesetzt.

3.1.4 Primer

Sämtliche Primer wurden von der Firma BioTez, Berlin bezogen, und sind in Anhang unter Abschnitt 7.2 aufgelistet.

3.1.5 Bakterienstämme, Zell- und Mauslinien

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme

Kurzbezeichnung, Kompetenz	Bezugsquelle	Stammbezeichnung
<i>E. coli</i> DH5 α (elektrokompetent)	AG Willnow, MDC Berlin	F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1
<i>E. coli</i> DH5 α (chem. kompetent)	Invitrogen, San Diego, CA, USA	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -
<i>E. coli</i> One Shot®TOP10 (chem. kompetent)	Invitrogen San Diego, CA, USA	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Tab. 4: Verwendete Zellen und Mauslinien

Linie	Bezeichnung und Herkunft
Murine embryonale Fibroblasten	neomycinresistente Mäuse unterschiedlicher Zuchtstämme (AG Willnow, MDC Berlin)
Murine embryonale Stammzellen	129S7/SvEvBrd-Hprt ^{b-m2} , AB 2.1 (AG Willnow, MDC Berlin)
Blastozysten	C57 BL/6 N (CCF, Boris Jerchow, MDC Berlin)
Ammenmäuse	NMRI (CCF, Boris Jerchow, MDC Berlin)
Wildtypmäuse zur kongenen Inzucht	C57 BL/6 N (MDC Berlin / FEM, Charité, Berlin)

3.1.6 Antikörper

Nachfolgend aufgelistete Antikörper wurden wie angegeben eingesetzt.

Tab. 5: Reagenzien für die Immunfluoreszenz

Protein/Epitop	Anti-körper	Herkunfts-spezies	Verdün-nung	Inkubation	Sonstiges	Hersteller
NKCC2	Anti-NKCC2	Meer-schweinchen	1:2000	90 min, 37° C	TAL-Marker	AG Bachmann, Charité, Berlin
ZO-1	Anti-ZO-1	Ratte	1:200	90 min, 37° C	Tight Junction Marker	Acris (NB110-68140)
Claudin-10	Anti-Cldn10	Kaninchen	1:400	90 min, 37° C	Keine Diffe-renzierung Claudin-10a/10b	Zymed (38-8400)
Ratten-Primärantikörper (Rat IgG)	Anti Rat*	Ziege	1:500	45 min, 25° C unter Abdun- kelung	Fluoreszenz- markiert (IF488)	Alexa (A11006)
Kaninchen-Primärantikörper (Rabbit IgG)	Anti Rabbit*	Ziege	1:500	45 min, 25° C unter Abdun- kelung	Fluoreszenz- markiert (IF594)	Alexa (A11037)
Meerschweinchen-Primärantikörper (Guinea Pig IgG)	Anti Guinea Pig*	Ziege	1:500	45 min, 25° C unter Abdun- kelung	Fluoreszenz- markiert (IF488)	Alexa (A11073)

Tab. 6: Reagenzien für Western-Blot-Analysen

Protein/Epitop	Anti-körper	Herkunfts-spezies	Verdün-nung	Inkubation	Sonstiges	Hersteller
Claudin-10	Anti-Cldn10	Kaninchen	1:1000	3 h, 25° C	Keine Diffe-renzierung Claudin-10a/10b	Zymed (38-8400)
Claudin-16	Anti-Cldn16	Kaninchen	1:1000	3 h, 25° C	Bindet im C-Terminus des Claudin-16	Zymed (34-5400)
β-Actin	Anti-β-Actin	Maus	1:10000	3 h, 25° C		Sigma-Aldrich (A5441)
Kaninchen-Primärantikörper (Rabbit IgG)	Anti-rabbit IgG	Schaf	1:1000	1 h, 25° C	polyklonal, POD-konjugiert	Roche (Lumi-Light ^{PLUS} Kit Western Blot)
Maus-Primärantikörper (Mouse IgG)	Anti-mouse IgG	Schaf	1:1000	1 h, 25° C	polyklonal, POD-konjugiert	Roche (Lumi-Light ^{PLUS} Kit Western Blot)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation genomischer DNA

Gewebeproben wurden durch 16 - 20 stündige Inkubation bei 55° C in Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,3 mg/ml Proteinase K, 0,2 % (w/v) SDS) einem Aufschluss unterzogen. Zwecks Reinigung der DNA wurde die Probe mit 1 VT P/C/I versehen und für 30 min in einem Überkopfschüttler rotiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und die obere, wässrige Phase zur Fällung der DNA in 2,5 VT 100 % Ethanol überführt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert, ggf. unter Agitation bei 55° C. Die Extraktion von DNA aus ES-Zell-Klonen erfolgte analog, jedoch mittels direkter Fällung des Verdau-Ansatzes (0,2 mg/ml Proteinase K, 0,1 mg/ml RNase A, 0,1% SDS) durch Zugabe von 1 VT Isopropanol und 1/10 VT 8 M LiCl.

3.2.2 Schnellpräparation von genomischer DNA zur Genotypisierung

2 mm einer Schwanzspitze wurden in 75 µl Lysispuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12) für 30 min bei 95° C aufgekocht und nach Abkühlen mit 75 µl Neutralisierungspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 5) versetzt [Truett et al., 2000]. 1 µl dieses Ansatzes wurde in 1:25 - Verdünnung zur Genotypisierung eingesetzt (siehe 7.2).

3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zwecks Gewinnung von Plasmid-DNA im Kleinmaßstab (Mini) wurden 5 ml einer Übernacht-Kultur in LB-Medium angeimpft und für 16 h bei 37° C schüttelnd inkubiert (GFL 3033 Inkubator). Die Präparation erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Standardprotokollen [Sambrook und Russell, 2001] oder unter Verwendung von Präparationskits (Qiagen Mini Kit). Präparationen in größeren Maßstäben wurden unter Vorlage eines größeren Kulturvolumens (50 ml bzw. 150 ml) und unter Einsatz von Präparationskits (Qiagen Midi- bzw. Maxi-Kit) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.4 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in DNA-Präparationen erfolgte photometrisch aus der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Einer Optischen Dichte von 1,0 entspricht eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Alternativ wurde die Konzentration mittels NanoDrop-Analysegerät (PeqLab ND-1000) bestimmt, oder nach Gelelektrophorese unter UV-Licht vergleichend mit DNA-Konzentrationsstandards abgeschätzt.

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurden von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt und die DNA sowie die verwendeten Primer nach Firmenangaben aufbereitet.

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Genabschnitte wurden mittels PCR-Maschinen (Biorad MyCycler bzw. Biometra T3 Thermocycler) unter Vorlage von spezifischen Primern, einer thermostabilen Polymerase und der entsprechenden *template*-DNA in einem geeigneten Puffersystem amplifiziert. Die Annealingtemperatur wurde stets experimentell bestimmt und orientierte sich an der empirisch berechneten Schmelztemperatur T_m aus der Basenzusammensetzung ($T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl G / C - Basenpaare}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A / T - Basenpaare})$).

PCR-Ansätze zur Amplifikation von Fragmenten zur weiterführenden Klonierung wurden, sofern nicht abweichend vermerkt, unter Einsatz des Expand PCR-Systems (Roche) oder des Phusion PCR-Systems (Finnzymes) durchgeführt. Bei Bedarf wurden Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende des Primers angefügt, um durch anschließenden Verdau des PCR-Produkts eine Umklonierung desselben zu ermöglichen. Nachfolgend sind typische Reaktionsansätze und -programme aufgelistet (Abb. 13).

Zusammensetzung	PCR-Programm	Zusammensetzung	PCR-Programm
1x Expand Puffer 1	2' 94°C	1x Phusion HF Puffer	30'' 98°C
0,3 µM for Primer	10'' 94°C	0,5 µM for Primer	10'' 98°C
0,3 µM rev Primer	30'' 60°C	0,5 µM rev Primer	20'' 60°C
0,5 mM dNTPs	60'' 68°C	0,2 mM dNTPs	30'' 72°C**
10 ng/µl ES-Zell-DNA	15'' 94°C	10 ng/µl ES-Zell-DNA	10' 72°C
0,05 U/µl Expand Polym.	30'' 60°C	0,02 U/µl Phusion Polym.	
1% DMSO (fakultativ)	60'' 68°C + 5kb/Zyklus*	1% DMSO (fakultativ)	
1 mM MgCl ₂ (fakultativ)	7' 68°C	1 mM MgCl ₂ (fakultativ)	
	* 40 s / kb Amplifikat		** 20 s / kb Amplifikat

Abb. 13: Typische Reaktionsansätze und -programme zur präparativen Amplifikation

PCR-Ansätze zur Detektion von Allelen oder Transgenen wurden i.d.R. unter Verwendung von Taq-Polymerase (NEB) durchgeführt. Eine Liste der verwendeten PCR-Programme für Alleldetektionen ist im Anhang (Abschnitt 7.2) aufgelistet.

3.2.7 Rekombinante PCR

Eine Abwandlung dieser Methode ist die rekombinante PCR oder auch Mutagenese-PCR, welche es ermöglicht, unter Verwendung speziell konstruierter Primer einzelne Basen eines Ausgangsvektors zu modifizieren, oder ganze Sequenzfolgen wie bei-

spielsweise loxP-Exzisionssequenzen an einer beliebigen Stelle des *templates* einzufügen. Die Mutagenese-PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

(i) Die DNA-Abschnitte *up*- und *downstream* der zu modifizierenden Sequenz wurden in zwei einzelnen Reaktionsansätzen amplifiziert. Aufgrund der räumlichen Lage unterscheidet man pro Reaktionsansatz zwischen „innerem“ Primer (im Bereich der einzufügenden Mutation) und „äußerem“ Primer (entfernter im 5'- bzw. 3'- Bereich bindend). Die „inneren“ Primer sind dabei an ihrem 5'-Ende modifiziert, d.h., sie enthalten die gewünschte Punktmutation, oder die Basen der neu einzufügenden Sequenz, und überlappen um wenige Basenpaare im 5'- Bereich.

(ii) Beide erhaltenen Amplifikate aus (i) dienten als *template* für einen neuen PCR-Reaktionsansatz. Unter Einsatz der „äußeren“ Primer wird der Gesamtabschnitt *up*- und *downstream* des Mutageneseortes amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt trägt die gewünschte Mutation und kann über einen geeigneten Restriktionsverdau in das Ausgangsplasmid umkloniert werden.

3.2.8 Restriktionsverdau

Sofern nicht abweichend angegeben, erfolgte der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen der Firma NEB nach Herstellerangaben. Im Falle von Plasmid-DNA erfolgten analytische Restriktionsverdaus unter Einsatz von 0,2 µg DNA und 4 U Enzym für 1 h, präparative Restriktionsverdaus unter Einsatz von 1 µg DNA und 10 U Enzym für 3 - 8 h. Genomische DNA wurde 16 h unter Verwendung von 10 - 15 µg und 25 U Enzym verdaut.

3.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsverdaus wurden entweder direkt oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Isolation der Bande aus dem Gel – unter zu Hilfenahme eines Skalpells – mit Hilfe eines Präparationskits (Roche High Pure PCR Product Purification Kit) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.10 Ligation

DNA-Fragmente und Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl in einem molaren Vektor : Insert-Verhältnis von üblicherweise 1 : 3 ligiert. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von 3 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen) und 2 µl 5x Ligation Buffer (Invitrogen) für 24 h bei 4° C - 16° C. Verwendete Vektoren waren zuvor durch Zugabe von 5 U / µg DNA antarktischer Phosphatase (NEB) für 1 h bei 37° C dephosphoryliert worden. Die Ligation von PCR-Produkten in Klonierungsvektoren (s. 3.1.2) erfolgte nach Herstellerangaben. Bei DNA-Fragmenten, welche mit Hilfe von Phusion-Polymerase

erstellt wurden, erfolgte im Anschluss an die PCR ein 15-minütiger Inkubationsschritt bei 72° C unter Zugabe von 0,5 U / μ l Taq Polymerase und 0,25 mM dNTPs, um auf diese Weise Poly-Adenosin-Überhänge am 3'-Ende des Amplifikats zu generieren.

3.2.11 Transformation

Die Transformation von zirkulärer DNA (Ligationsansatz oder Plasmid in geeigneter Verdünnung) erfolgte, sofern nicht abweichend angegeben, unter Verwendung von chemisch kompetenten oder elektrokompenten *E. coli* DH5 α -Zellen.

50 - 100 μ l chemisch kompetente Zellen wurden mit 1 μ l DNA-Lösung versetzt, für 30 min bei 4° C inkubiert und anschließend einer Hitzeschockinduktion (30 s, 42° C; 30 s, 4° C) unterzogen.

50 μ l elektrokompente Zellen wurden mit 1 μ l DNA-Lösung versetzt, für 5 min bei 4° C inkubiert und elektroporiert (Biorad „Gene Pulser“, R = 200 Ω , U = 1,8 kV, C = 25 μ F).

Der Ansatz wurde im Anschluss an die Transformation in 800 μ l SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37° C schüttelnd inkubiert. Nach Ausplattieren auf Selektionsmedium wurden die Zellen für 16 h bei 37° C inkubiert.

3.2.12 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die größenspezifische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in Agarosegelen unter Zusatz von 0,4 μ g/ml Ethidiumbromid und unter Verwendung von TAE oder TBE als Laufpuffer. Je nach Fragmentgröße wurden Gele mit Agarosegehalt von 0,7 % bis 2 % eingesetzt. Aufzutragende Proben wurden mit 10x Ladepuffer (50% v/v Glycerol, 200 mM EDTA, 1 Spatelspitze / 100 ml Orange G) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 - 130 V in Elektrophoresekammern (Life Technologies Gibco BRL Horizon 11-14). Die Visualisierung von Nukleinsäuren erfolgte mittels einer Dokumentationsanlage unter UV-Beleuchtung (Intas Gel Imager).

3.2.13 Southern blotting und Radiomarkierung

Diese Methode ermöglicht die Detektion von DNA-Rearrangements im Rahmen des Screenens von ES-Zellen und bietet sich zudem als zusätzliche Methode zur Genotypisierung von Mäusen bei der Züchtung von transgenen Linien an. Hierbei macht man es sich zunutze, dass die jeweiligen Allele - je nach Genotyp - bei Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym ein abweichendes Restriktionsmuster aufweisen.

Verdaute Proben genomischer DNA wurden ÜN gelelektrophoretisch aufgetrennt, so dass die zu untersuchenden Restriktionsfragmente hinsichtlich ihrer Größe distinkt voneinander separiert waren. Das Gel wurde zunächst für 10 min in 0,25 M HCl über-

führt, darauf folgend für 30 min in 0,4 M NaOH schwenkend inkubiert. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente ÜN auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-XL, Amersham) unter Verwendung von 0,4 M NaOH als Transferlösung geblottet. Die Membran wurde darauf durch zweistündiges Backen bei 80° C einer DNA-Fixierung unterzogen und durch Inkubation in 2x SSC neutralisiert. Nachfolgend wurde die Membran in einem Hybridisierungsrohr mit Hybridisierungslösung (PreHyb Buffer, Amersham) für mindestens 1 h bei 65° C rotierend prähybridisiert.

Die Hybridisierung erfolgte mit Detektionssonden, welche so gewählt waren, dass sie spezifisch das entsprechende Restriktionsfragment aus dem DNA-Gemisch erkennen. Für die Radiomarkierung der Sonden mit $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP wurde das *Prime-it random primer labelling kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die markierte Sonde wurde mittels Aufreinigungssäulchen (MicroSpin S-300 HR Columns, Amersham) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt, und hinsichtlich ihrer Aktivität vermessen (Beckman Counter LS6000 SC). Sofern ihre spezifische Aktivität einen Wert von mindestens $1,5 \cdot 10^9$ cpm / μg Sonden-DNA im Markierungsansatz erreichte, wurde die radiomarkierte Sonde dem Prähybridisierungsansatz in einer Menge von 250000 counts / 10 ml Hybridisierungslösung beigelegt. Die Hybridisierung wurde ÜN bei 65° C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 2x unter Niedrigstringenz- (2x SSC, 0,1 % SDS, 15 min 25° C) sowie 2x unter Hochstringenz-Bedingungen (0,1x SSC, 0,5 % SDS, 15 min 65° C) gewaschen und für 24 h auf Imager-Platten (BAS-IP-MS 2300, Fuji Film) exponiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des FLA 3000 Scanners sowie der Software BASReader 3.14 und AIDA 3.15, die anschließende Bildbearbeitung mittels Adobe Photoshop.

3.2.14 Präparation von RNA

Das Gewebe wurde einer Trizolextraktion (Invitrogen) unterzogen und Gesamt-RNA wurde gemäß den Herstellerangaben präpariert. Das Gewebe wurde mit Trizol (1 ml / 100 mg Ausgangsmaterial) versetzt und mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde der Ansatz mit 0,2 VT Chloroform versetzt, ausgeschüttelt und zentrifugiert (15 min, 12000 x g, 4° C). Die obere, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem äquivalenten Volumen an Isopropanol versetzt. Nach einem zehnminütigen Inkubationsschritt wurde die präzipitierte RNA pelletiert (10 min, 12000 x g, 4° C), mit 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen an RNase freiem Wasser gelöst. RNA-Präparationen wurden nachfolgend mittels RNeasy-Aufreinigungssäulen (Qiagen) nach Herstellerangaben weiterbearbeitet. Proben zur cDNA-Gewinnung (3.2.15) wurden dabei gemäß des Protokolls während der Säulenreinigung einem DNase-

Behandlungsschritt unterzogen. RNA zur Analyse von Expressionsprofilen (Microarray, Pkt 3.2.17) wurde vor ihrem Einsatz einer 30-minütigen DNase-Behandlung unterzogen (20 U DNase / mg RNA, Invitrogen) und anschließend über RNEasy-Aufreinigungssäulchen aufbereitet. Bestimmungen von Reinheitsgrad und Konzentration erfolgten unter Einsatz eines NanoDrop-Meßgerätes (PeqLab).

3.2.15 Gewinnung von cDNA

Einzelstrang-cDNA wurde mit Hilfe des Omniscript RT Kits unter Vorlage von 1,8 µg gereinigter RNA, 1 µM Oligo-dT-Primern, 0,5 mM dNTPs, 10 U RNase Inhibitor und 4 U Reverser Transkriptase (alle Qiagen) nach Herstellerangaben synthetisiert. Zur Kontrolle von Kontamination mit genomischer DNA wurde zur Synthese von cDNA parallel ein Präparationsansatz ohne Zugabe reverser Transkriptase mitgeführt.

3.2.16 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR / RealTime PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung des Expressionsniveaus ausgewählter Gene auf mRNA-Ebene. In den vorliegenden Versuchsreihen wurde die Quantifizierung von Amplifikaten ermöglicht über den Zusatz des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green im PCR-Reaktionsansatz. Über vergleichenden Fluoreszenzgehalt ausgewählter Amplifikate in der exponentiellen Phase der PCR lassen sich somit Aussagen über die Ausgangsmenge an *template* und somit den Grad der Expression des entsprechenden Gens treffen. Der Ct-Wert, welcher den PCR-Zyklus mit signifikant exponentiell ansteigendem Fluoreszenzsignal oberhalb des Detektionsschwellenwertes markiert, ist ein logarithmisches Maß für die Ausgangsmenge an *template*; je niedriger dieser Wert ist, umso höher ist das Ausgangs-Expressionsniveau des Gens in der Probe.

Der relative Abgleich der Genexpression erfolgte über vergleichende Analysen mit Referenzgenen (*housekeeping* Gene). Diese standardisierten Kontrollgene sind im Optimalfall unter vergleichenden Bedingungen in identischem Maße exprimiert. Mit Hilfe der Software geNorm 3.5 wurde anhand von sechs verschiedenen Nierengewebepräparationen Hprt1 sowie Hmbs als die stabilsten Referenzgene getestet und somit als geeignete Kontrollgene für die gewählten Versuchsbedingungen festgelegt. Reaktionsansätze wurden unter Verwendung des Power SYBR Green Amplification Kits zur Amplifikation eingesetzt (Abb.14).

Zusammensetzung	PCR-Programm
1x LightCycler RT-PCR Reaction mix	10' 95°C
0,5 – 1 x Resolution Solution	15'' 95°C
1/100 VT cDNA	60'' 60°C
0 – 1 mM MgCl ₂	60'' 95°C
200 nM for Primer	} x 40
200 nM rev Primer	
1/50 VT LightCycler RT-PCR Enzyme mix	58 – 95°C Dissoziation

Abb. 14: Quantitative PCR – Reaktionsansätze und Programme

Die verwendeten Primer zur Detektion der Zielgene sind im Abschnitt 7.2 aufgelistet. Sie wurden vorzugsweise im 3'-Bereich der mRNA lokalisiert, unter Verwendung der Software Primer3 generiert oder der RT Primer Database entnommen. Im Anschluss an die Amplifikation wurde der Reaktionsansatz einem Temperaturgradienten zur Dissoziation doppelsträngiger cDNA unterzogen. Anhand des Verlaufs der Dissoziationskurve wurde kontrolliert, dass keine Primer-Dimere oder unspezifischen Reaktionsprodukte die quantitative Auswertung störend beeinflussen.

Während der exponentiellen Phase der PCR geht man unter idealen Bedingungen von einer Amplifikatverdopplung pro Zyklus aus. Mit Hilfe des Programms LinRegPCR wurde außerdem die Effizienz (E) der Amplifikatvermehrung pro Zyklus berechnet. Dieser zusätzlich angewendete Algorithmus gleicht Reaktionsbedingungen hinsichtlich ihrer Rate der Amplifikatvermehrung ab ($E \ll 2$ versus $E \leq 2$) und vermeidet somit Fehler in der Auswertung bei zwei zu vergleichenden Ansätzen.

Die RealTime-Analysen zur Konfirmation der Microarray-Daten wurden arbeitsgruppenintern von Marchel Stuver durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

geNorm 3.5: <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/#download>

Primer3: <http://primer3.sourceforge.net>

RT Primer Database: <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/>

LinRegPCR: <http://www.gene-quantification.de/download.html#linregpcr>

3.2.17 Markierung von RNA für Microarray-Analysen

50 µg präparierter RNA wurden mit Hilfe des AMIL1791 Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kits nach Herstellerangaben aufbereitet. Hierbei wurde die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Anschließend wurde die cDNA in doppelsträngige DNA umgewandelt und durch *in vitro* Translation unter Verwendung biotinmarkierter Nukleotide zur Synthese von biotinylierter cRNA eingesetzt. Diese markierte cRNA wurde zur Hybridisierung auf Microarray-Chips (MouseWG-6v2.0, Illumina) aufgetragen, welche nach Auswaschen ungebundenen *labels* ausgewertet wurden.

Die aufgeführten Arbeitsschritte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers am MDC Berlin, AG Hübner, von Herrn Dr. Patone und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

3.2.18 Generierung des *Cldn10* Targetingvektors

Der kurze Homologiearm wurde mittels Primern 32/33 amplifiziert und über einen KpnI / EcoRI- Verdau in den gleichermaßen linearisierten Vektor pGEM DTA ligiert. Der Abschnitt bestehend aus DTA-Kassette und Homologiearm wurde in den Vektor pBSSK neo3A lox über eine EcoRI- / NotI-Restriktion umklontiert.

Der lange Homologiebereich, welcher die Exons 2 und 3 des *Cldn10*-Gens beinhaltet, wurde mit den Primern 47/65 amplifiziert und in pGEM T-Easy ligiert. Im Anschluss wurde durch Mutagenese-PCR (s. 3.2.7) unter Verwendung der Primerkombinationen 77/78 und 79/80 (1. Runde) sowie 77/80 (2. Runde) eine loxP-Sequenz *downstream* des Exon 3 eingefügt. Dieser Vektor wurde nachfolgend einer Sall / NotI Restriktion zwecks Erhalts des Fragments aus Mittel- und langem Arm unterzogen. Der Vektor mit den Selektionskassetten und dem kurzen Homologiearm wurde mittels XhoI / NotI Verdau linearisiert. Das Targetingkonstrukt (Abb.15) erhielt man durch Ligation beider Fragmente unter Ausnutzung eines komplementären Überhangs der XhoI-Sall- Enden.

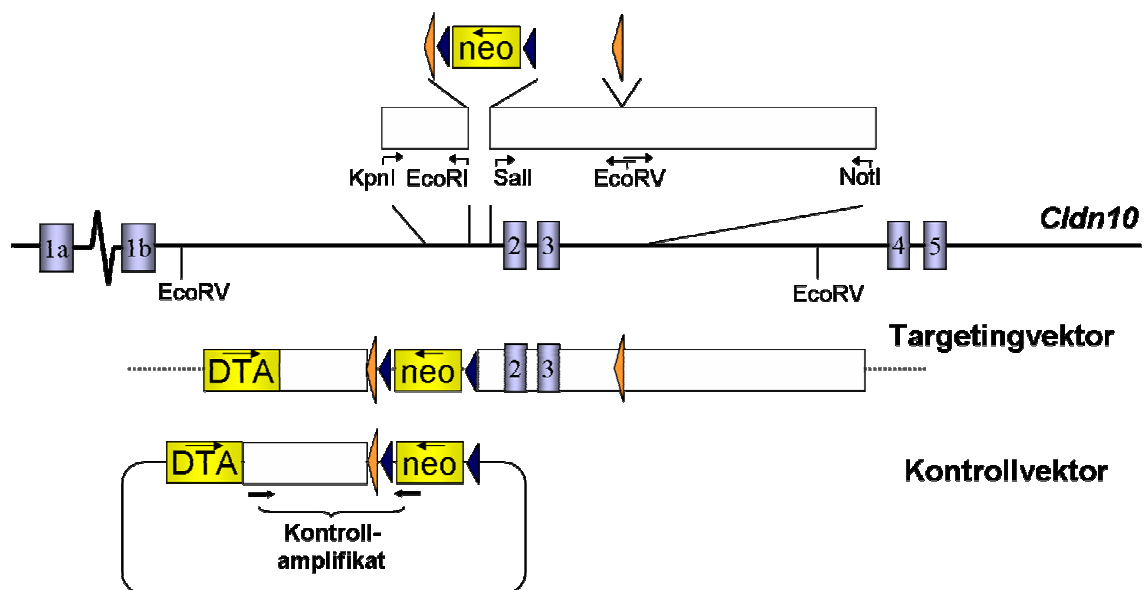


Abb. 15: Schema des *Cldn10*-Lokus, des Targeting- und des Kontrollvektors.

Die Homologiearme sind als weiße Rechtecke, die Selektionsmarker gelb, die Exons hellblau dargestellt. Zusätzlich sind die Exzisionssequenzen loxP (orange) und FRT (dunkelblau) markiert, die durch Mutagenese (symbolisiert durch Doppelpfeil) eingefügt wurden, oder Bestandteil des Vektors pBSSK neoA3 lox sind. Restriktionsstellen sind eingezeichnet, kleine Pfeile markieren Primer zur präparativen Amplifikation. Primer zum Nachweis homologer Rekombination sind als dicke schwarze Pfeile dargestellt. Der Locus ist nicht 100% maßstabgetreu abgebildet.

Parallel zu den Klonierungsarbeiten wurde ein Kontrollvektor als Positivkontrollansatz erstellt, bestehend aus einem Kontrollhomologiearm, flankiert von den Selektionsmar-

kern. Für seine Konstruktion wurde ein in *upstream*-Richtung elongierter Homologiearm amplifiziert (Primer 31/33). Dieser Kontrollarm wurde in Analogie zum kurzen Homologiearm restriktiert und umklont, um schließlich den Kontrollvektor bestehend aus DTA-Kassette, Kontrollarm und Neo-Kassette zu erhalten. Der Kontrollvektor beinhaltete folglich einen Teil der DNA-Sequenz, wie er ausschließlich im rekombinierten Allel vorliegt. Er konnte somit im Rahmen einer PCR als Positivkontrolle für das *Screenen* homolog rekombinierter ES-Zellen dienen (Abb. 16 A, B): Eine Kombination aus Primern im Neomycin-Gen und äußeren Kontrollarm sollte nur im Falle eines homologen Austauschs ein Amplifikat generieren [Willnow und Herz, 1994]. Targeting- und Kontrollvektor für *Cldn10* wurden in unserem Labor von Marchel Stuver erstellt.

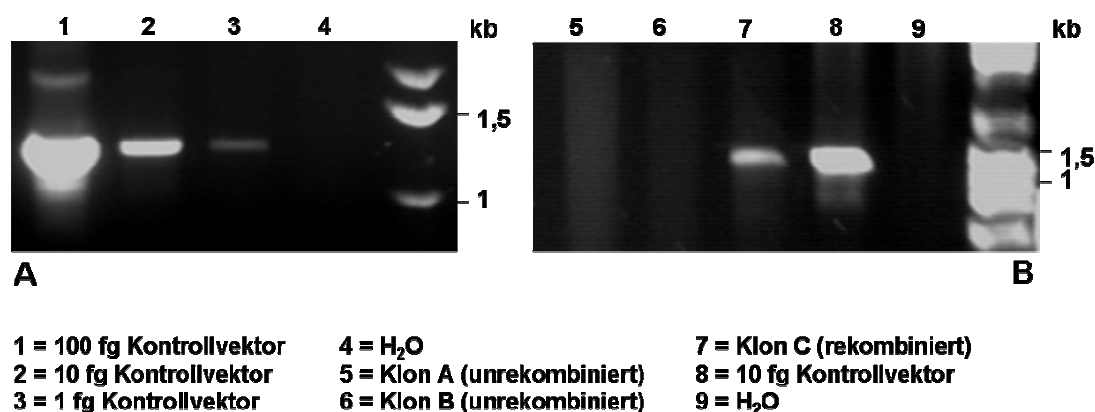


Abb. 16: *Cldn10* – Kontroll-PCR.

Dilutionsreihe des Kontrollvektors zum Ermitteln der Sensitivität (A) und sein Einsatz zum Nachweis homologer Rekombinanden am *Cldn10*-Lokus (B).

3.2.19 Generierung des *Cldn16* Targetingvektors

Der lange Homologiebereich des Konstrukts, welcher das Exon 2 des *Cldn16*-Gens beinhaltete, wurde unter Verwendung der Primerkombination 29/27 amplifiziert und in den Klonierungsvektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) subkloniert. Der Homologiebereich wurde anschliessend durch Einfügen einer loxP-Sequenz im Rahmen einer Mutagenese-PCR (Primer 58/61 und 59/60, 2. Runde 58 und 59, s. 3.2.7) in den Mittelarm und den langen Arm unterteilt.

Der kurze Homologiearm wurde mittels Primern 25/26 erstellt und über einen KpnI / EcoRI- Verdau in den ebenfalls mit KpnI und EcoRI linearisierten Vektor pGEM DTA kloniert. Daraufhin wurde das Gesamtfragment aus DTA-Kassette und Homologiearm über EcoRI / NotI-Restriktion mit dem gleichermaßen aufgeschnittenen pBSSK neoA3 lox-Vektor ligiert.

Die weitere Umklonierung erfolgte über einen NotI / XhoI-Verdau der beiden erstellten Konstrukte und eine anschließende Ligation des Fragments - bestehend aus langem und Mittelarm - in den Vektor mit dem kurzen Homologiearm und Selektionsmarkern

(Abb. 17 A). Für die Konstruktion eines Kontrollvektors erfolgte die Amplifikation des Kontrollarmfragments mit Hilfe der Primer 24/26, welcher analog zur Konstrukterstellung verdaut und umklont wurde zwecks Erstellung des Vektors bestehend aus DTA-Kassette Kontrollarm und Neo-Kassette.

Der Aufbau beider Vektoren ist folglich vergleichbar derer aus 3.2.18 und der Nachweis der homologen Rekombination erfolgte nach dem gleichen Prinzip (Abb. 17 B, C). Zusätzlich wurde eine Kombination aus Detektionsprimern am Integrationsort der loxP-Sequenz dazu verwendet, das Vorliegen ebendieser Modifikation nachzuweisen (Abb. 17 D).

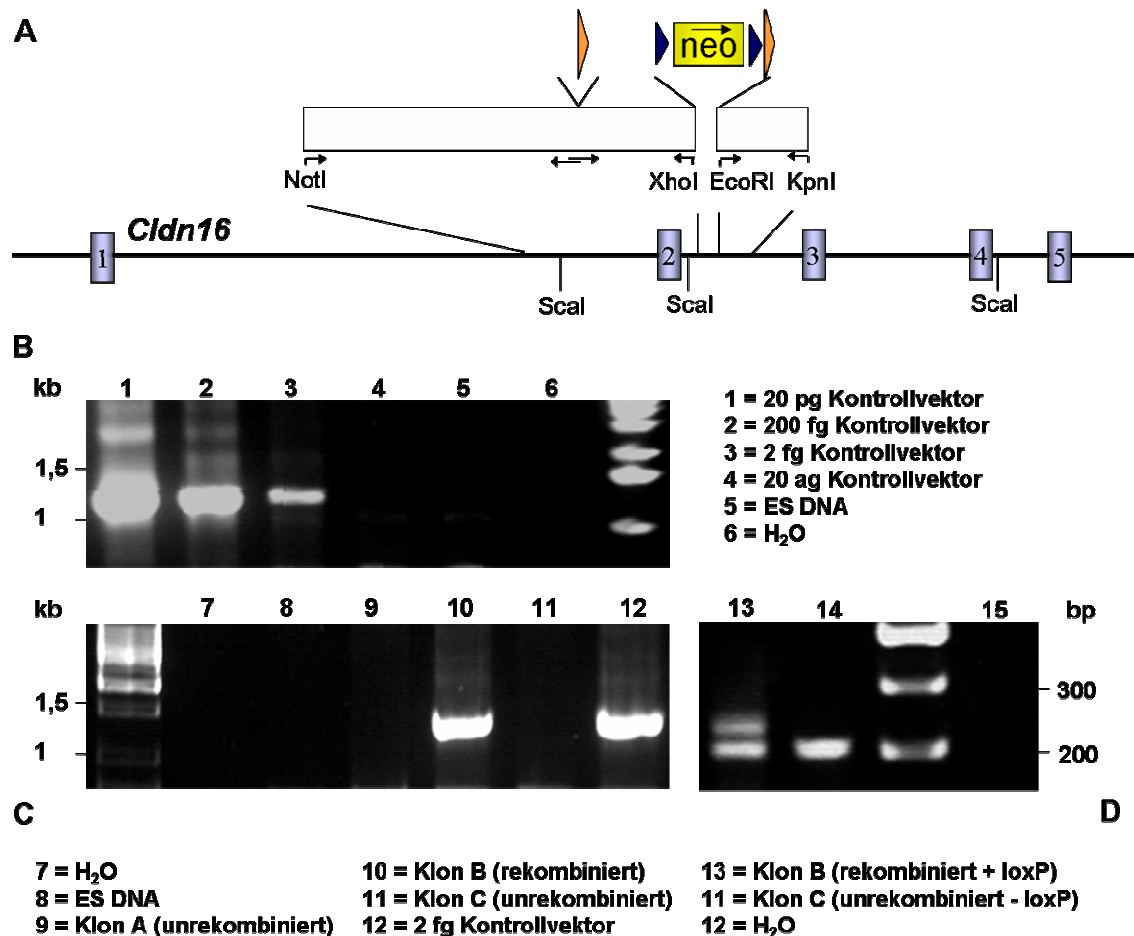


Abb. 17: *Cldn16* – Locus zum Targeting und Kontroll-PCR.

Strategie zur Generierung des Targetingvektors (A). Der Locus ist nicht 100% maßstabgetreu abgebildet. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 15. Dargestellt ist außerdem eine Dilutionsreihe des Kontrollvektors zum Ermitteln der Sensitivität (B) und sein Einsatz zum Nachweis homologer Rekombinanden am *Cldn16*-Locus (C). Das Vorliegen der loxP-Sequenz wurde mittels Primern *up-* und *downstream* des Integrationsortes in einer PCR nachgewiesen. Ein um 34 bp größeres Amplifikat ist die Folge dieser Modifikation (D, siehe Laufspur 13).

Die Vektoren für die *Cldn10*- und *Cldn16*-Loci wurden vor Einsatz in der Zellkultur durch analytische Restriktionsverdaus und durch Sequenzierung der codierenden Bereiche und Exzisionssequenzen verifiziert und mittels NotI-Restriktion linearisiert.

3.3 Zellkulturarbeiten

3.3.1 Allgemeines

Alle verwendeten Zellen wurden in Gewebekulturschalen in einem Inkubator (Heraeus) bei 37° C unter 5 % CO₂-Zufuhr in befeuchteter Atmosphäre kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten, sofern möglich, an einer Sterilbank unter Verwendung von sterilen Arbeitsmaterialien. Medien und Zusätze wurden vor Gebrauch auf 37° C angewärmt. Zwecks besserer Haftung insbesondere von ES-Zellen wurden Gewebekulturschalen vor dem Einsatz bei Bedarf gelatinisiert, d.h. mit einer in PBS angesetzten 0,1 %igen Lösung von Gelatine beschichtet, für 30 min bei 37° C inkubiert und anschließend abgesaugt.

3.3.2 Kultivieren und Inaktivieren muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

MEF wurden mit MEF-Kulturmedium kultiviert und alle 2 - 3 Tage passagiert. Das Umsetzen erfolgte in einem 1:2 - 1:3 *split* in der Regel bis zur Passage p6. MEF finden Verwendung als nährstoffspendende Versorgerzellen (*Feeder*-Zellen) bei der Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen und wurden daher 1 - 2 Tage vor jeder Neuaussaat von ES-Zellen in Form eines konfluenten *Feeder*-Rasens auf gelatinisierte Gewebekulturschalen aufgebracht. Um eine Nahrungskonkurrenz zu den ES-Zellen zu verhindern, wurden die MEF vor diesem letzten Passagieren für 2-3 Stunden mit frischem Medium unter Zusatz von Mitomycin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml kultiviert, welches die DNA-Neusynthese und somit das weitere Teilen der Zellen behindert.

MEF-Medium: *Dulbecco's MEM + 10% Fetales Kälberserum (FKS), 1% Non Essential Amino Acids (NEAA), 1% Penicillin/Streptomycin.*

3.3.3 Präparation von MEFs

Für die Gewinnung primärer Fibroblasten wurden murine Embryonen neomycinresistenter Mauslinien (s. 3.1.5) verwendet. Einer trächtigen Maus wurden E 10.5 - E 14.5 Tage alte Embryonen entnommen. Nach Entfernen von Kopf, Herz und Leber wurde das restliche Gewebe ÜN bei 4° C in 0,05 % Trypsin / EDTA inkubiert, um zunächst das Gewebe dem Trypsin zugänglich zu machen. Durch 15minütige Inkubation bei 37° C wurde der Verdau aktiviert und anschließend durch Zugabe von 5 ml DMEM + 10 % FKS gestoppt. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Zellen vereinzelt, durch Zentrifugation sedimentiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf einer Gewebekulturschale ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert, die längerfristige Lagerung erfolgte in Aliquots bei -80° C.

3.3.4 Trypsinieren und Passagieren von MEFs

Die umzusetzenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung (0,025 % Trypsin / EDTA, Gibco) versetzt, bis der Zellrasen leicht bedeckt war. Die Trypsinierung erfolgte bei 37° C für 5 - 7 Minuten, anschließend wurden die Zellen mit mindestens der 3-fachen Menge Kulturmedium versetzt und durch Pipetieren vereinzelt. Nach Zentrifugation (3 min, 200 x g) wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge frischen Kulturmediums resuspendiert und auf Gewebekulturschalen ausgesät.

3.3.5 Einfrieren und Auftauen von MEFs

Zwecks mittel- bis langfristiger Lagerung von Zellklonen erfolgte ein Einfrieren der entsprechenden Klonaliquots bei -80 bzw. -150° C. Dazu wurden die Zellen nach Trypsinierung resuspendiert, in Einfriermedium (Kulturmedium mit 5 % DMSO) aufgenommen und in Cryoröhrchen aliquotiert bei einer gewünschten Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml. Das Einfrieren auf -80° C erfolgte langsam in geeigneten Isopropanol-haltigen Einfrierboxen oder in Styroporbehältern. Längerfristig zu lagernde Klone wurden 24 Stunden später in Stickstoff bei -150° C überführt. Das Auftauen von Zellen erfolgte durch schnelles Anwärmen auf 37° C und anschließendes Überführen in Kulturmedium. Nach Zentrifugation (3 min, 200 x g) wurde das Zellpellet in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen ausgesät. Nach ca. 16 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel.

3.3.6 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Die Kultivierung muriner ES-Zellen erfolgte stets auf gelatinierten, *feeder*beschichteten Qualitäts-Gewebekulturschalen (Greiner). Zell-Aussaaten für DNA-Präparationen wurden auf gelatinierten Gewebekulturschalen ohne MEF vorgenommen. ES-Zell-Kolonien wachsen im nichtdifferenzierten Zustand als runder bis tropfenförmiger Zellverband mit klar erkennbarem Saum. Um ein Differenzieren der pluripotenten Zellen zu verhindern, wurde spezielles ES-Medium mit zuvor ausgetesteten Zusätzen verwendet. Die Passagierung von ES-Zellen erfolgte bei entsprechender Koloniedichte oder Klongröße in einem Verhältnis von 1:2 - 1:10. Der Mediumwechsel wurde mindestens alle 24 Stunden vorgenommen, jedoch spätestens 16 Stunden nach Auftauen oder einer Passage. ES-Medium: 10 g / l Dulbecco's MEM, 1,82 g / l NaHCO₃ (Gibco), 15 % FKS (komplett inaktiviert), 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % 100x MEM Non Essential Amino Acids (NEAA), 7 % 2-Mercaptoethanol (Sigma), 1 % murines LIF (ESGRO, Chemicon).

3.3.7 Präparation muriner ES-Zellen

Embryonale Stammzellen wurden von der AG Willnow, MDC, bezogen, deren Gewinnung anderweitig beschrieben wurde [Willnow und Herz, 1994].

3.3.8 Trypsinieren und Passagieren von ES-Zellen

Das Trypsinieren und Passagieren von ES-Zellen erfolgte analog zu Pkt 3.3.4, jedoch wurde 0,25 % Trypsin / EDTA (Gibco) verwendet.

3.3.9 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

Das Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen wurde weitgehend wie unter 3.3.5 beschrieben durchgeführt unter Verwendung von ES-Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % FKS & 10 % DMSO). Bei Zellen aus 3,5 cm - 15 cm Gewebekulturschalen erfolgte eine Aliquotierung in Cryoröhrchen bei einer gewünschten Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml. Isolierte ES-Zell-Klone aus 96er-Gewebekulturschalen wurden direkt in diesen in einem Gesamtvolumen von 200 µl Einfriermedium / well eingefroren und maximal 3 Monate bei -80° C gelagert, um positiv getestete Klone nach Bedarf auftauen zu können.

3.3.10 Elektroporation von ES-Zellen und Isolation einzelner Klone

ES-Zellen einer konfluenten 10 cm-Kulturschale (entspricht etwa 1×10^7 Zellen) wurden trypsinisiert, in ES-Medium aufgenommen und durch dreimalig wiederholtes Zentrifugieren (3 min, 200 x g) und Resuspendieren in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und mit 100 µg linearisiertem Knockout-Vektor in PBS versetzt bei einem Endvolumen von 1,6 ml, welches auf zwei 1 ml Küvetten (Biorad) aufgeteilt wurde. Die Elektroporation (Biorad Gene Pulser II) erfolgte mit einem Spannungspuls von 260 mV und einer Kapazität von 500 µF, die Zeitkonstante lag idealerweise bei $t = 7,5$ s. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium überführt und auf 10 cm Gewebekulturschalen in einer Dichte von ca. 1000 Zellen / Schale ausgesät. Die Selektion homologer Rekombinanden erfolgte durch Zusatz von Geneticinsulfat (200 µg/ml G418, Life Technologies), einsetzend 24 - 48 h nach Elektroporation. Nach etwa 6 Tagen unter Positivselektion wurden bestehende Klone unter Zuhilfenahme eines Binokulars mit Hilfe einer Pipette abgehoben und mit 30 µl Trypsinlösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37° C wurde der Vorgang durch Applikation von 70 µl Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und in vorbereitete 96er-Kulturschalen unter Vorlage von 100 µl Kulturmedium transferiert.

Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen im 1:4 split passagiert, so dass 4 Kopien der ursprünglichen 96er-Kulturschale vorlagen. Hiervon dienten zwei der Kulturschalen der weiteren Kultivierung der Zellen, welche nach zwei Tagen eingefroren wurden. Die beiden anderen Kulturschalen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dienten der Gewinnung von DNA zwecks Identifizierung homologer Rekombinanden. Einzelne positiv getestete Klone der eingefrorenen Platten konnten somit nach Bedarf wieder aufgetaut und expandiert werden.

3.3.11 Blastozysteninjektion und -transfer in scheinschwangere Ammen

Positive ES-Zell-Klone wurden propagiert und für die Injektion in Blastozysten eingesetzt. Die verwendeten Blastozysten waren zuvor aus superovulierten Spenderweibchen des Stammes C57 BL/6 präpariert worden. Pro Blastozysten wurden 12 ES-Zellen injiziert. 12 - 14 derartig präparierter Blastozysten wurden in ein scheinschwangeres Ammentier implantiert. In der Regel werden 2 - 3 Ammenmütter pro ES-Zell-Klon eingesetzt. Für die Keimbahngängigkeit der ES-Zell-Linie wurden die chimären Nachkommen mit Tieren des Stammes C57 BL/6 N rückverpaart. Blastozystenpräparation, Injektion und Transfer wurden an der CCF des MDC von Frau Katja Becker durchgeführt.

3.4 Tierexperimentelle Arbeiten und Gewebepreparationen

3.4.1 Allgemeines

Die Mäuse wurden in Gruppen von 3 - 8 Tieren unter 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten, die Unterbringung erfolgte unter SPF-Bedingungen in ventilierten Makrolonkäfigen Typ 3 - 4. Standardfutter („Alleinfutter für Mäuse zur Zucht“, Ssniff) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Erstellung der transgenen Linien, deren Züchtung und Haltung erfolgte zunächst am Max-Delbrück-Centrum (Robert-Rössle-Str. 10, Berlin, AG Willnow) und im Anschluss am FEM Unit 2 (Krahmerstr. 12, Berlin). Experimentelle Arbeiten an den Tieren (Stoffwechselkäfigversuche sowie finale Blut- und Organentnahmen) wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, am Max-Delbrück-Centrum, Berlin, oder am Center for Cardiovascular Research (CCR), Charité, Campus Berlin-Mitte, durchgeführt.

Die Tötung juveniler und adulter Tiere erfolgte durch kraniozervikale Dislokation, oder nach Narkotisierung (siehe 3.4.4) über eine Herzperfusion. Jungtiere bis zum Lebens- tag 14 (P14) wurden durch Dekapitation getötet.

3.4.2 Generierung transgener Linien und Zucht

Chimäre Tiere wurden aufeinander folgenden Verpaarungsschritten zur Elimination von codierenden Sequenzen (Neomycinresistenzmarker, codierende Sequenz des Zielgens) unterzogen, um auf diese Weise die konditionelle und die konventionelle Zuchtlinie zu etablieren. Die Zucht der Mauslinien erfolgte durch Rückverpaarungen heterozygoter Tiere mit Wildtypmäusen des Stammes C57 BL/6 N. Tiere für experimentelle Analysegruppen wurden durch Verpaarung von heterozygoten Elterntieren generiert und standen somit als Gruppen von Wurfgeschwistern zur Verfügung (siehe auch Abb. 28).

Tiere wurden ab einem Alter von ca. 7 Wochen nach Erreichen der Geschlechtsreife zur Verpaarung eingesetzt. Die Entwöhnung und Ohrlochmarkierung der Jungtiere geschah im Alter von 3 - 4 Wochen. Zur Genotypisierung der Nachkommen wurde genetisches Material aus Schwanzspitzenbiopsien gewonnen.

3.4.3 Gewinnen und Vermessen von Blut- und Urinproben

Zur Gewinnung von Urinproben wurden Mäuse ab einem Alter von 6 Wochen für einen Zeitraum von 12 h einzeln in Stoffwechselkäfigen für Mäuse (Tecniplast) gehalten. Die Tiere hatten während dieser Zeit freien Zugang zu Wasser. Bei neugeborenen Mäusen wurde Spontanurin durch Blasenstimulation gesammelt. Der gewonnene Urin wurde bis zur Analyse bei -20° C gelagert.

Die Entnahme von Blut erfolgte in Ethernarkose durch retrobulbäre Punktion des Venenplexus. Bei neugeborenen Mäusen erfolgte die Sammlung des Gesamtblutes im direkten Anschluss an die Dekapitation. Das gewonnene Vollblut wurde 30 min kühl gelagert und anschließend wurden durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 4° C) die zellulären Bestandteile abgetrennt. Das so erhaltene Serum wurde bis zur Analyse bei -20° C eingefroren. Die Sammlung von Urin- und Serumproben geschah zeitnah im Abstand weniger Stunden.

Die Bestimmung von freien Elektrolyten und Kreatinin erfolgte aus Serum und Sammelurin. Zum Erhalt eines geeigneten Probenvolumens wurden dazu Serum- und Urinproben neugeborener Mäuse 1:2 bis 1:8 mit *Aqua bideest.* verdünnt; eine Ausnahme bilden Serumanalysen bei Neonaten der *Cldn16*-Knockout-Linie, hier wurden jeweils zwei Proben vereinigt und 1:2 mit *Aqua bideest.* verdünnt. Die Analysen wurden im Zentrallabor der Charité, Campus Mitte, von Frau Stopp durchgeführt.

Für die Analyse des Parathormon-Gehaltes wurde die Serumprobe mit Hilfe des „Mouse Intact PTH ELISA Kits“ (Immutopics, San Clemente, CA, USA) nach Herstelleranleitung aufbereitet und mit einem ELISA-Analysegerät (Dynatech MR 5000) vermessen. Zur Bestimmung von Calcitriol (1,25(OH)₂VitD₃) wurde die Serumprobe zwecks Errei-

chens eines geeigneten Analysevolumens 1:4 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Die Messungen erfolgten mittels „1,25 Dihydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA Kit“ (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) nach Angaben des Herstellers und wurden im Radionuklid-Zentrallabor der Helios-Kliniken, Berlin-Buch, von Frau Pohl durchgeführt.

3.4.4 Organentnahme und -aufbereitung

Medikamentenapplikationen sowie operative Schnittführungen und Organpräparationen erfolgten standardgemäß. Die Tiere wurden zur Gewebeentnahme durch kraniozervikale Dislokation bzw. Dekapitation getötet oder in Ketamin-Xylazin-Narkose (100 mg/kg Ketavet, Pfizer; 20 mg/kg Rompun, Bayer) mit 4 % PFA in PBS über die linke und rechte Herzkammer perfundiert.

Zur Gewinnung von RNA und Gesamtein wurden die Organe als Ganzes entnommen, präpariert, in Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80° C bis zur Aufarbeitung eingefroren.

Zur Fixierung von Geweben für immunhistochemische Analysen wurden die Organe in 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 1 h entwässert und daraufhin einer aufsteigenden Saccharosegradienten-Inkubation unterzogen (1h 10% Saccharose in PBS, 1h 20% Saccharose in PBS, 16h 30% Saccharose in PBS bei 4° C). Anschließend wurden die Organe mit Hilfe von Isopentan (Fluka), durch flüssigen Stickstoff gekühlt, eingefroren und bei -80° C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Die Aufbereitung von Gewebe zur Paraffineinbettung erfolgte durch Entwässerung in 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 12 - 16 h. Anschließend wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe prozessiert (jeweils 2 h 40 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol). Das Gewebe wurde daraufhin zweimalig für 1 h in Xylol inkubiert, in Paraffin-6 (1 h, 67° C) und schließlich in Paraffin-9 (1 h, 67° C) überführt. Abschließend erfolgte die Einbringung in Paraffinblöcke unter Verwendung von Histologie-Einbettkassetten.

Sofern nicht anders angegeben, wurde entnommenes Gewebe direkt nach Präparation in Fixierungsreagenz überführt. Im Falle der Präparation von neonatalem Lungengewebe wurde zusätzlich in einer Versuchsreihe kollabiertes Lungengewebe durch Injektion entfaltet; dies sollte der Simulation des Nativzustandes dienen. Nach Entnahme des Organs erfolgte mittels Kanüle und Spritze eine direkte Applikation von 4 % Paraformaldehydlösung in die einzelnen Lungenflügel. Das Präparat wurde sogleich zur anschließenden histologischen Aufbereitung und Analyse des entfalteten Gewebes in selbiges Fixierungsreagenz überführt.

3.4.5 Präparation von Tubulussegmenten für transepitheliale Messungen

Zur Präparation von frischem Nierenmaterial wurden CO₂-narkotisierte Mäuse durch Dekapitation ausgeblutet; anschließend wurde eine gesamte Niere entnommen und durch Perfusion mit Ringerlösung (s. 7.3) durch die renale Arterie von Blut befreit.

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells in 0,1 mm dünne Scheiben geschnitten und in Sortierlösung überführt. Unter einem Invertmikroskop (Axiovert 10, Zeiss) wurden TAL-Segmente aus den Gewebeschnitten präpariert und unter Zuhilfenahme eines Videoaufzeichnungssystems (Visitron Systems) in die Perfusionsapparatur eingespannt. Das Tubulussegment wurde dabei in eine Badlösung eingebracht und an einem Ende an einer doppelläufigen Pipette fixiert. Diese Anordnung ermöglicht es, über den einen Kanal den Tubulus luminal mit Perfusionslösung zu spülen. Zusätzlich wird die transepitheliale Spannung zwischen apikaler (Perfusionslösung) und basolateraler (Badlösung) Epithelseite detektiert. Der andere Kanal ermöglicht die Injektion von definierten Strömen auf der luminalen Seite des Tubulus. Aufgrund dieses Arrangements sind - zusätzlich zur Applikation von Perfusat - das Monitoring der elektrischen Größen und die Berechnung des transepithelialen Widerstandes möglich.

Unter kontinuierlicher Applikation von 0,1 mM Furosemidlösung auf der luminalen Seite wurde der aktive NKCC2-vermittelte transzelluläre Transport inhibiert. Die Badlösung unterlag schrittweise einer unterschiedlichen Zusammensetzung an Ionen. Anhand dieser Anordnung wurden transepitheliale Diffusionspotentiale mit Hilfe der Goldman-Hodkin-Katz-Gleichung bestimmt:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_{Na} [Na]_b + P_{Cl} [Cl]_l}{P_{Na} [Na]_l + P_{Cl} [Cl]_b}$$

Goldman-Hodkin-Katz-Gleichung zur Berechnung von Diffusionspotentialen.

V = Diffusionspotential, R = Gaskonstante, T = Temperatur, z = Zahl der Ladungsträger, F = Faraday-Konstante, P = Ionenpermeabilität, l = luminal, b = basolateral

Sämtliche Messungen erfolgten unter konstanter Temperatur von 38° C und unter Abgleich der Osmolalität apikaler und basolateraler Lösungen mittels Zusatz von Mannitol. Abgewandelte Gleichungen zur Ionenpotentialberechnung sowie Zusammensetzung der unterschiedlichen Badlösungen sind im Anhang (s. 7.3) verzeichnet.

Präparation der Tubuli und Messungen der Diffusionspotentiale wurden von Qixian Shan und Markus Bleich, Universität Kiel, im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise für die vorliegende Arbeit - des vollständigen Überblicks wegen - zur Verfügung gestellt.

Sortierlösung: 140 mM NaCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 1,6 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 10 mM Na-Acetat, 1 mM α-Ketoglutarat, 1,3 mM Ca-Gluconat, pH 7,4

3.4.6 Analyse von Lungenparametern in murinen Neonaten

Die Bestimmung der Atemfrequenz geschah durch Auszählung der Atemzüge pro Minute, erkennbar durch sichtbare Flankenbewegung. Pro Tier wurden zwei Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Zur Analyse des Wassergehaltes im Lungengewebe wurden die entnommenen Lungenflügel mit Hilfe einer Feinwaage gewogen, und anschließend durch 10-minütiges Erhitzen in der Mikrowelle einer vollständigen Feuchtigkeitsreduktion unterzogen. Anschließend wurde das Gewicht erneut bestimmt, und aus dem Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht der Wassergehalt des Lungengewebes ermittelt. Gewichtsreduktionen auf unter 15 % des Originalwertes deuten auf ein Lungenödem hin. An gefärbten Gewebeschnitten wurde zudem eine Abschätzung hinsichtlich des Status der Immunabwehr getroffen. Hierzu wurde das Vorliegen von Lymphozyten in den Alveolarräumen als Hinweis auf inflammatorische Prozesse gewertet.

3.4.7 Genehmigungen für tierexperimentelle Arbeiten

Nachfolgend aufgeführte Projekte waren vor Beginn der Arbeiten durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Berlin, genehmigt worden:

Tierversuchsantrag: G0099 / 07 (Charakterisierung von *Cldn16*^{-/-}-Mäusen)

Tötungsanzeigen: T 0284 / 08 (Tötung von *Cldn16*^{-/-}-Tieren zu Präparationszwecken),

T 0213 / 08 (Tötung von *Cldn10*^{-/-}-Tieren zu Präparationszwecken)

3.5 Proteinchemische und histologische Methoden

3.5.1 Proteinpräparation

Entnommenes Gewebe wurde in Lysepuffer überführt (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% w/v Triton-X-100, 0,1% w/v SDS, 1 Tablette „Complete Proteaseinhibitor“ (Roche) / 10 ml Puffer; 1 ml / ¼ Niere) und mit Hilfe eines Ultra-Turrax zerkleinert, anschließend mit einem Homogenisator bearbeitet. Die Proteinpräparation wurde unter leichter Agitation 30 - 60 min auf Eis inkubiert, und anschließend einer Separation von zellulären und membranassoziierten Proteinkomponenten unterzogen. Dazu wurden in einem Zentrifugationsschritt (15 min, 4° C, 15000 x g) die membrangebundenen Proteine pelletiert, und das Pellet in 200 µl gekühltem Lysispuffer resuspendiert. Der Überstand enthielt die lösliche, zelluläre Fraktion zur Analyse.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinlösungen wurden unter Einsatz des BCA Protein Assay Kits (Pierce) hinsichtlich ihrer Konzentration vermessen. Eine Ausverdünnungsreihe von BSA, vom Hersteller als Standard mitgeliefert, diente der Kalibrierung der Messung.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinproben wurden unter Zusatz eines reduzierenden Laemmli-Puffers für 5 min bei 95° C aufgekocht. Gesamtproteinmengen zwischen 5 und 40 µg wurden zum Auftrag auf 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele eingesetzt. Mittels Elektrophorese (90 min, 110 V, 20 mA) wurden enthaltene Proteinkomponenten entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

5x Laemmli-Puffer: 125 mM Tris pH 6.8; 10 % w/v SDS, 20 % Glycerol, 10 % 2-Mercaptoethanol; 0,01 % Bromphenolblau

12,5 % Trenngel: 41 % v/v Acrylamid, 23,5 % v/v Tris (1,5 M, pH 8,8), 0,1 % v/v SDS, 0,1 % v/v APS, 0,05 % v/v TEMED.

Sammelgel: 0,1 % v/v SDS, 0,1 % v/v APS, 0,1 % v/v TEMED, angesetzt in Sammelgelpuffer (25,6 % v/v Tris (0,5 M, pH 6,8), 17,4 % v/v Acrylamid)

3.5.4 Western Blot

Mittels SDS-PAGE separierte Proteine wurden unter Einsatz einer Blotting-Apparatur (BioRad) auf eine Polyvinylidenmembran (Perkin Elmer) transferiert (60 min, 100 V, 4° C). Die Membran wurde zur Reduktion von Hintergrundsignal einem Blockierungsprozess unterzogen. Primär- und Sekundärantikörperlösungen wurden entsprechend des Schemas unter 3.1.6 zur Inkubation eingesetzt und im Anschluss jeweils dreimal gewaschen. Die Entwicklung erfolgte unter Einsatz des Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Detektionssystems (Roche Diagnostics), die Visualisierung mittels Lumi-Imager (Böhringer-Mannheim) und der Software Lumi-Analyst 3.1.

Transferpuffer: Tris-Glycin (10x Stocklösung, BioRad)

Blockierlösung: PBST (PBS, supplementiert mit 0,2 % Tween20) + 5 % w/v Albumin-Fraktion V (Merck, 16 h, 4° C)

Waschschritte: 2x 10 min PBST, 1x 10 min TBST (TBS, supplementiert mit 0,2 % Tween20)

3.5.5 Präparation von Gewebeschnitten

Gewebepräparate, die eine Dehydrierung mittels Saccharose durchlaufen hatten (s. 3.4.4), wurden unter Kühlung mit Hilfe eines Cryo-Schneidegerätes (Leica CM 1900) als 0,4 µm dicke Schnitte auf Objektträger (Langenbrinck, Superfrost-Qualität) gebracht und fanden Verwendung für histologische Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen.

Gewebeschnitte von PFA-fixierten, paraffineingebetteten Präparaten (s. 3.4.4) wurden analog mit Hilfe eines Mikrotoms (Jung RM 2025, Leica) angefertigt.

Vorbereitend auf die Färbung wurden Paraffinschnitte über eine absteigende Alkoholreihe (2x 5 min Xylol, je 2 min 100 %, 95 %, 80 %, 70 % Ethanol) entparaffiniert und mehrfach in *Aqua bidest.* gewaschen, Cryoschnitte wurden aufgetaut und direkt in *Aqua bidest.* überführt.

3.5.6 Immunfluoreszenzanalysen an Cryoschnitten

Die Präparate wurde zweimal für 5 min mit PBS⁺ (PBS, supplementiert mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und zur besseren Permeabilisierung des Gewebes für 30 min in 0,5 % Triton X-100 in PBS überführt. Die Gewebeschnitte wurden erneut zweimal in PBS⁺ gewaschen und einer einstündigen Inkubation in Blockierlösung (PBS⁺ mit 5 % Serum der Sekundärantikörper-Spezies) unterzogen, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu minimieren. Die Applikation von Primär- und Sekundärantikörperlösungen erfolge entsprechend der Herstellerangaben (s. 3.1.6). Zwischen einzelnen Inkubationsschritten wurde dreimalig mit Blockierlösung gewaschen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte für 5 min mit DAPI-Lösung (1 µg/ml in PBS⁺) gegengefärbt, in *Aqua bidest.* gewaschen, kurz in 100 % Ethanol überführt und nach Trocknung eingedeckelt (Pro Tags Mount Fluor / VectaShield). Die mikroskopische Auswertung der angefärbten Gewebeschnitte (Leica CTR MIC Fluoreszenzmikroskop, OpenLab Software) erfolgte innerhalb von 12 - 72 h.

3.5.7 Detektion von Gewebekalzifizierungen

Kalzifizierungsprozesse in Nierengewebe wurden mittels von Kossa-Färbung untersucht. Diese Methode ermöglicht eine Detektion von phosphathaltigen Kristallisationen in histologischen Präparaten. Die Gewebeschnitte wurden für eine Stunde unter Licht in 5 % Silbernitratlösung (Merck) inkubiert, anschließend mehrfach in *Aqua bidest.* gewaschen und zur Reduktion nichtreagierter Silberionen für 5 min in 5 % Natriumthiosulfatlösung (Merck) überführt. Die Schnitte wurden anschließend gewaschen, wahlweise für 4 min mit 1 % Neutralrotlösung (Roth) gegengefärbt und einer aufsteigenden Reihe organischer Lösungen (je 2 min 70 %, 80 %, 95 %, 100 % Ethanol, 2x 5 min Xylol) zur Einbettung in DePeX-Mounting Medium (VWR) unterzogen.

3.5.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Kern-Plasma-Färbung)

Die Präparate wurden für 4 min in Hämatoxylinlösung (Hämalaun nach Mayer, Merck) inkubiert und anschließend für 3 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Differenzieren wurden die Gewebeschnitte kurz in 1 % HCl-Lösung überführt, für 7 min unter fließendem Wasser gespült und anschließend für 4 min in Eosinlösung (1 % w/v Eosin angesäuert mit Eisessig) gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen, über

eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol transferiert und eingebettet (siehe 3.5.7). Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Leica DM LB2) unter Verwendung der Software AxioVision.

3.6 Statistik, Bioinformatik und computergestützte Analysen

3.6.1 Statistik

Statistische Untersuchungen von drei Analysegruppen (pH-Werte, Ionenpermeabilitäten am isolierten Tubulus, Elektrolyt- und Hormonparameter) wurden mittels GraphPad Prism 5-Software durchgeführt, zur Auswertung wurde der einfaktorielle ANOVA angewendet, gefolgt vom Bonferroni's Multiple Comparison Test. Graphische Darstellungen der Messwerte erfolgten als Anzeige des Mittelwertes \pm Standard-Fehler des Mittelwertes (SEM). Für statistische Analysen von zwei Vergleichsgruppen (Microarray-Experimente) wurde in Microsoft Excel der t-Test nach Student (ungepaart, zweiseitig) angewendet. Folgende Symbolik wurde hinsichtlich des Signifikanzniveaus getroffen: (*): $0,01 < p\text{-Wert} < 0,05$; (**): $0,001 < p\text{-Wert} < 0,01$, (***): $p\text{-Wert} < 0,001$; (n.s., nicht signifikant): $p\text{-Wert} \geq 0,05$. Horizontale Linien oberhalb der Balkendiagramme samt Signifikanz-Symbol markieren die verglichenen Analysegruppen. Die statistische Auswertung von RealTime PCR Daten wurde mit dem Programm Rest 2008 durchgeführt (<http://www.gene-quantification.de/rest-2008.html>).

3.6.2 Auswertung von Expressionsprofilen

Differenzielle Expressionsanalysen (auch als Microarray-Analysen, Transkriptomanalysen referiert) muriner Nieren-mRNA, hybridisiert auf Illumina MouseWG-6v2.0 Microarray-Chips (vergl. 3.2.17), wurden mit Hilfe der Programme BeadStudio 3.1 und Microsoft Excel ausgewertet. Chip-interne Kontrollen, bestehend aus Hybridisierungs-, Hintergrund- (Negativ-), Waschstringenz-, Markierungs- sowie *Houskeeping*-Gen-Kontrollen garantierten die Validität der erhaltenen Daten. Rohdaten aus Microarray-Analysen wurden mittels Quantil-Algorithmus normalisiert. In Microsoft Excel exportierte Daten wurden gemäß des Signifikanzniveaus (3.6.1) klassifiziert. Sofern differenziell unterschiedlich reguliert, wurde das Kandidatengen anschließend mittels RealTime-Expressionsanalyse bestätigt und einer weiteren Klassifizierung und Eingruppierung hinsichtlich des beteiligten Stoffwechselweges unterzogen.

3.6.3 Computergestützte Analysen

Mit Hilfe der Software DNASTar (Lasergene) wurden DNA- und Proteinsequenzanalysen durchgeführt. Recherchen von Literatur und Sequenzdaten erfolgten über die Internetpräsenz des NCBI (National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Informationen zu Genomsequenzen wurden außerdem dem UCSC Genome Browser der University of California (<http://www.genome.ucsc.edu>) entnommen.

4 Ergebnisse

Die Tight Junction Proteine der Claudin-Familie bestimmen die Barrierefunktion in Epithelien und Endothelien. In der Niere kommt ihnen eine tragende Rolle in der Ionenhomöostase zu. In dieser Arbeit sollte anhand von Tiermodellen untersucht werden, inwieweit der Verlust der Gene *Cldn16* und *Cldn10* Auswirkungen auf die renale Ionenhomöostase hat. Da Zellkulturen nur unzureichend die meist komplexe *in-vivo* Situation abbilden, wurden Knockout-Linien der beiden murinen Gene erstellt, welche durch eingehende Untersuchungen hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Nierenanatomie und -physiologie charakterisiert wurden.

4.1 Knockout des murinen Gens *Cldn16*

4.1.1 Generierung der *Cldn16*-Targetingkonstrukte

Cldn16 hat 5 Exons und liegt auf Chromosom 16. Die Erstellung des Targetingvektors mit Exzisionssequenzen diente der Generierung einer konditionellen Mauslinie, aus welcher mittels Cre / lox-Technologie ein Total-Knockout generiert werden kann (Abb. 18). Dieser Targetingvektor war so konzipiert, dass in einem zweistufigen Prozess auf Keimbahnenebene ein Teilbereich der codierenden Gensequenz deletiert werden konnte.

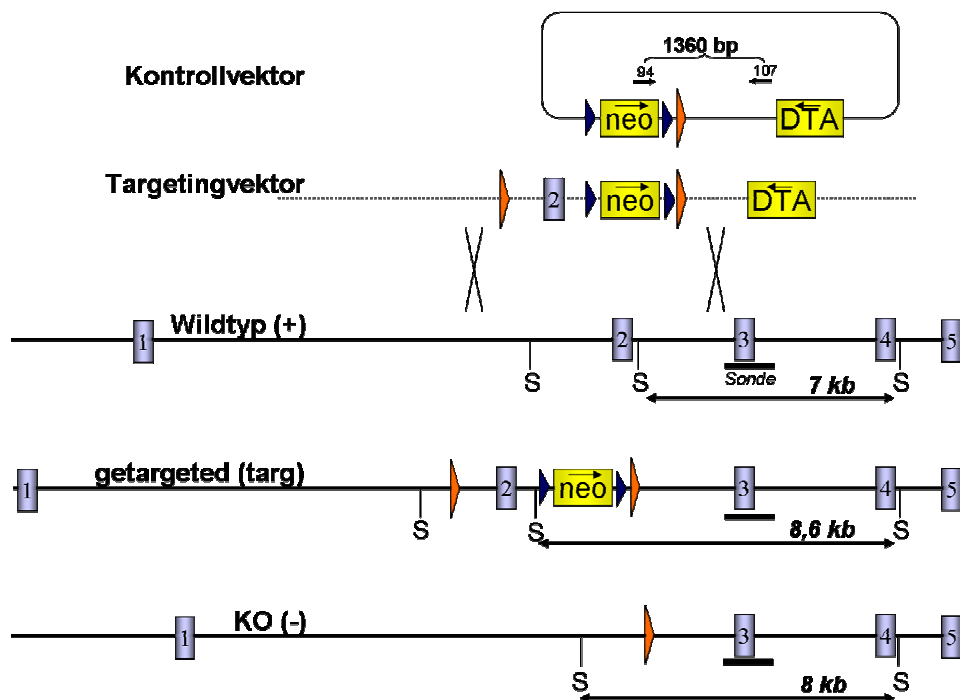


Abb. 18: Targetingstrategie und Allelvarianten des murinen *Cldn16*-Gens.

Abgebildet sind die fünf Exons des murinen *Cldn16* (hellblau), Exzisionssequenzen loxP (Dreieck orange, groß) und FRT (Dreieck blau, klein), die Resistenzmarker Neomycin- (*neo*) und Diphtherietoxin- α -Kassette (DTA) sowie *Scal*-Restriktionsstellen (S). Die Lage der Detektionssonde ist als schwarzer Balken markiert. Doppelseitige Pfeile weisen auf Fragmentgrößen in Southern Blot-Analysen hin.

Im Organismus wurde somit die Expression eines funktionsfähigen Proteins verhindert. Für die Erstellung des *Cldn16*-Knockout-Vektors wurden als Positiv- und Negativselektionsmarker (siehe auch 4.1.2) codierende Sequenzen für Neomycin-Phosphotransferase sowie Diphtherietoxin A (*Corynebacterium diphtheriae*) eingesetzt, die jeweils unter der Kontrolle eines eukaryotischen PGK-Promotors standen. Die Homologiearme des Konstruktes wurden mittels PCR unter Vorlage von genomischer DNA des Mäusestamms Sv129 hergestellt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass der genetische Hintergrund identisch mit den später eingesetzten ES-Zellen ist. Dagegen birgt die Verwendung von DNA aus Genbanken die Gefahr, dass aufgrund leichter Sequenzabweichungen eines Sv129 Substammes die homologe Rekombination weniger effizient abläuft, oder stammspezifische Besonderheiten, etwa Mechanismen zur Genregulation, den Phänotyp beeinflussen.

Zunächst wurde folgender Ansatz zur Erstellung des konditionellen *Cldn16*-Knockout-Vektors entwickelt: Es wurde versucht, das Exon 1 des murinen *Cldn16*-Lokus zu deletieren. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Amplifikation konnte ein Segment nahe Exon 1 mittels PCR nicht erfolgreich generiert werden, so dass ein *Targeting* des nachfolgenden Exon 2 geplant wurde. Von einem Knockout der nachfolgenden Exons 3, 4 oder 5 wurde abgesehen, da nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, dass es zur Expression eines trunkierten, teilfunktionellen Proteins kommen könnte. Ein kombiniertes Deletieren mehrerer Exons bot sich aufgrund der langen Intronsequenzen nicht an. Das Exon 2 hat eine Größe von 103 bp, so dass beim Verlust desselben davon auszugehen ist, dass sich ein Sprung im Leserahmen ergibt. Vorab angestellte Berechnungen zur Codonsequenz wiesen zudem ein Stop-Codon beim neu entstehenden Übergang zwischen den Exons 1 und 3 auf. Es ist dadurch zu erwarten, dass kein funktionsfähiges Claudin-16-Protein exprimiert wird (Abb. 19).

<p>ATGAAGGATCTTCTTCACTACGCTGCCTGCTTCTTGGCCATATCTCCACTGGGTTTTCATCGTGGCCACCTGGACAGACTGTTGGATGGTGAACGGCTGAT</p> <p>M K D L L Q Y A A C F L A I F S T G F L I V A T W T D C W M V N A D</p> <p>GACTCCCTGGAGGTGAGCACTAAATGCAGAGGCCTGTGGTGGGAGTGTGTAACAAACGCTTTTGATGGGATTCGAACCTGCCATGAGTACGACTCCATATAT</p> <p>D S L E V S T K C R G L W W E C V T N A F D G I R T C D E Y D S I Y</p> <p>GCAGAACATCCCTGAAGCTGGTGGTAACTCGAGCACTGATGATCAGAGCTGACATTTTAGCTGGCTTTGGATTGATCACCCTGCTCCTGGTCTGGACTGT</p> <p>A E H P L K L V V T R A L M I T A D I L A G F G F I T L L L G L D C</p> <p>GTGAAGTTCCTACCTGATGACCCACAATTAAGTCCGCGCTTTGCTTTGTGTCAGGGACACATTACTCATTGCAGGTACCCAGGAATCATCGGTTCTGTG</p> <p>V K F L P D D P Q I K V R L C F V A G T T L L I A G T P G I I G S V</p> <p>TGGTATGCTGTGGATGTTTACGTCGAACGCTCCTCTCGTTTTACACAAATATATTTCTGGGATCCAAATATAAATTGGTTGGTCCCTGGCTTGGAAATG</p> <p>W Y A V D V Y V E R S S L V L H N I F L G I Q Y K F G W S C W L G M</p> <p>GCTGGGTCTTTGGGTGCTTTTGGCAGGAGCTCTCTCACCTGCTGTTTGTACCTCTTCAAGATGTTGGGCTGAGAGGAACACCTTATGCCATGAGG</p> <p>A G S L G C F L A G A L L T C C L Y L F K D V G P E R N Y P Y A M R</p> <p>AAGCCCTATTCAACTGCAGGTGTGTCCATGGCCAAGTCCTACAAGGCCCTCGGACAGAGACAGCCAAATGTATGCTGTAGACACCAGAGTATAA</p> <p>K P Y S T A G V S M A K S Y K A P R T E T A K M Y A V D T R V *</p> <p>Cldn16^{+/+}: DNA- und Proteinsequenz</p>	<p>ATGAAGGATCTTCTTCACTACGCTGCCTGCTTCTTGGCCATATCTCCACTGGGTTTTCATCGTGGCCACCTGGACAGACTGTTGGATGGTGAACGGCTGAT</p> <p>M K D L L Q Y A A C F L A I F S T G F L I V A T W T D C W M V N A D</p> <p>GACTCCCTGGAGTGA</p> <p>D S L E *</p> <p>Cldn16^{-/-}: DNA- und Proteinsequenz</p>
--	---

Abb. 19: *Cldn16* - DNA- und Proteinsequenz im Wildtyp- und Knockout-Tier.

Durch Verlust von Exon 2 ändert sich der Leserahmen und es kommt zum frühzeitigen Kettenabbruch durch ein Stop-Codon (*). Die Exons sind farbig unterlegt: Exon 1 - grün, Exon 2 - grau, Exon 3 - rosa, Exon 4 - gelb, Exon 5 - blau. Die Aminosäuresequenz ist darunter ersichtlich.

Durch die Deletion eines genomischen Abschnittes besteht die Möglichkeit, dass diese Veränderung am Locus die Exon/Intron-Struktur beeinflusst. Der Verlust des Exons 2 könnte somit zur Folge haben, dass während der Transkription andere genomische Abschnitte ausweichend als codierende Sequenz fungieren und als alternative Exons in mRNA-Sequenz transkribiert werden. Zum Einschätzen der Exon/Intron-Wahrscheinlichkeit des Gens wurde mit Hilfe des Programms GenScan.1 eine Vorhersage berechnet. Im Falle des Verlusts von Exon 2 ergab sich laut diesem Algorithmus eine 17 %ige Wahrscheinlichkeit, dass ein Intronabschnitt *upstream* der deletierten DNA-Sequenz als alternatives Exon 2 erkannt wird. Es liegt zudem im gleichen Leserahmen wie Exon 2 (Abb. 20).

Cldn16^{+/+}

Predicted genes/exons:

Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Intr	+	2475	2601	127	0	1	86	94	214	0.934	21.56
1.02	Intr	+	13409	13511	103	1	1	71	42	120	0.491	4.53
1.03	Intr	+	16712	16876	165	0	0	99	84	220	0.999	21.71
1.04	Intr	+	20415	20606	192	1	0	135	116	1	0.974	6.14
1.05	Term	+	21737	21870	134	0	2	73	38	143	0.970	5.07
1.06	PlyA	+	21934	21939	6							1.05

Predicted peptide sequence(s):

>unknown|GENSCAN predicted peptide 1|240 aa

YLFAAMKDLQLQYACFLAIFSTGFLIVATTCGMVNADDSLEVSTKCRGLWECVTNAF
DGIRTCDEYDCIYAEHPLKLVTRALMITADILAGEGFTITLLGLDCVKFLPDDPOIKVR
LCFVAGTTLLIAGTTPGIIGSVNYVAVDVYVERSSLVLNHFILGIGYKFGWCSWLGMAGSLG
CLFAGALLTCCLYLFKDVGPENYFAMRKYTAGVSMKSYKAPRTETAKMYADTRV

Cldn16^{-/-}

Predicted genes/exons:

Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Intr	+	2475	2601	127	0	1	86	94	214	0.932	21.56
1.02	Intr	+	10554	10587	34	2	1	68	98	27	0.176	-1.42
1.03	Intr	+	16712	16876	165	0	0	99	84	220	0.999	21.71
1.04	Intr	+	20415	20606	192	1	0	135	116	1	0.974	6.14
1.05	Term	+	21737	21870	134	0	2	73	38	143	0.970	5.07
1.06	PlyA	+	21934	21939	6							1.05

Predicted peptide sequence(s):

>unknown|GENSCAN predicted peptide 1|217 aa

YLFAAMKDLQLQYACFLAIFSTGFLIVATTCGMVNADDSLEFVHKGTFKGIYMKLVVT
RALMITADILAGEGFTITLLGLDCVKFLPDDPOIKVRLCFVAGTTLLIAGTTPGIIGSVNY
AVDVYVERSSLVLNHFILGIGYKFGWCSWLGMAGSLGCLFAGALLTCCLYLFKDVGPEN
YFAMRKYTAGVSMKSYKAPRTETAKMYADTRV

Abb. 20: Vorhergesagte Intron/Exon-Struktur am *Cldn16*-Lokus.

Dargestellt ist das Ergebnis der algorithmischen Berechnung der Genstruktur, sowie die resultierende Aminosäuresequenz (gelb). Die Vorhersage mittels GenScan.1 weist eine relative Wahrscheinlichkeit für ein alternatives Exon (rot) auf, welches in diesem Fall ein modifiziertes Protein im gleichen Leserahmen generieren würde.

Um zu verhindern, dass eine Expression dieses Abschnitts und damit eines modifizierten, möglicherweise teilfunktionellen Claudin-16 stattfindet, wurde eine zusätzliche Mutagenese durchgeführt (s. 3.2.7). Eine Base des alternativen Exons wurde durch eine Punktmutation in ein Stop-Codon umgewandelt. Im Falle eines Erkennen und Transkribieren dieses alternativen Exons ist somit von einem Translationsstop und einem Kettenabbruch auszugehen; ein weitergehender Sprung auf Exon 3 im ursprünglichen Leserahmen findet nicht statt.

Vor Fertigstellung des Vektors zum konditionellen *Targeting* erfolgte zudem das Einfügen einer zusätzlichen *loxP-site* mittels Mutagenese-PCR (s. 3.2.7), welche für die nachfolgende Exzision des codierenden Abschnittes benötigt wird.

Parallel dazu wurde der Knock-In eines Cre-Transgens am *Cldn16*-Lokus angestrebt. Hierzu sollte das Startcodon der Cre-codierenden DNA-Sequenz auf jenes des *Cldn16*-Gens platziert werden. Auf diese Weise wurden zwei Ziele verfolgt: Zum einen erhält man auf diese Weise eine transgene Mauslinie, welche eine Expression des Exzision-

senzyms Cre unter der Kontrolle des *Cldn16*-Promotors aufweist und somit auf den TAL des Nephrons begrenzt sein sollte – ein geeigneter Untersuchungsansatz für die Generierung von murinen, TAL-spezifischen Defizienzmodellen. Zum anderen besteht die Option, die Mauslinie homozygot als *Cldn16^{cre/cre}* zu züchten. In diesem Falle wäre die Expression des *Cldn16* analog zum klassischen Knockout unterbunden, und die Mauslinie könnte für eine bestätigende Phänotypisierung des *Cldn16*-Total-Knockouts herangezogen werden. Aufgrund von technischen Problemen – das *Targeting* des Locus konnte in mehreren Runden nicht erfolgreich realisiert werden – wurde dieses Teilprojekt jedoch nicht weiter verfolgt.

4.1.2 *Cldn16*: ES-Zell-Targeting und Erstellung der transgenen Linie

Der Knockout-Vektor wurde zur homologen Rekombination in embryonale Stammzellen eingebracht. Durch die Positiv- und Negativselektionsstrategie wurde ein Anwachsen homologer Rekombinanden begünstigt:

- (i) Unter Verwendung des Selektionsmediums wird ein Anwachsen ausschließlich solcher Zellen ermöglicht, die das Konstrukt inklusive Neomycinresistenzmarker in ihre DNA inkorporiert haben.
- (ii) Die Diphtherietoxin-Alpha-Kassette wiederum codiert für ein zytotoxisches Produkt und sollte im Falle einer Zufallsintegration des gesamten Targetingvektors ins Genom zum Absterben der Zelle führen. Im Falle eines korrekten *Targetings* jedoch verbleibt dieser Abschnitt außerhalb des Rekombinationsbereiches, verfehlt seine zytotoxische Wirkung und die Zellen überleben.

Die Verifizierung von ES-Zell-Klonen erfolgte durch Southern-Blotting sowie eine speziell optimierte Kontroll-PCR (siehe auch 3.2.19). Die Analyse mittels Southern Blot wurde so gewählt, dass homolog rekombinierte Klone durch die Manipulation am Locus ein verändertes Restriktionsmuster des getargeteten Allels aufwiesen (siehe auch Abb. 18, 21 A).

Der *Cldn-16*-Lokus wies in unabhängigen Runden des *Targetings* eine geringe Rekombinationseffizienz auf. Aus 1081 präparierten ES-Zell-Klonen konnte ein homologer Rekombinant identifiziert werden, welcher einer Blastocysteninjektion zum Erstellen einer transgenen Linie unterzogen wurde. Chimäre Nachkommen wurden mit transgenen Mäusen verpaart, welche eine ubiquitäre Expression des Rekombinationsenzym Cre aufweisen (C57BL/6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J). Auf diese Weise kommen auf Keimbahnebene eine intakte Kopie des *Cldn16*-Allels sowie ein getargetetes Allel zusammen. Letzteres wird unter Einwirkung des nukleär wirkenden Cre-Transgens einem Rekombinationsprozess zwischen den loxP-Sequenzen unterzogen, so dass Exon 2 sowie Neomycin-Resistenzmarker exzidiert werden. Die Nachkommen dieses Zucht-

schritts sind heterozygot und tragen eine intakte und eine defekte Kopie des *Cldn16*-Gens (*Cldn16*^{+/-}). Man kann sie direkt untereinander verpaaren, um Claudin-16-defiziente Tiere zu generieren, oder durch kongene Inzucht auf den gewünschten Mausstamm zurückkreuzen (siehe auch Abb. 30).

Die Genotypisierung der Mäuse hinsichtlich der Allel-Varianten (+, targ, -) erfolgte mittels Genotypisierungs-PCR. Weil die gewählten Primerkombinationen je nach *template* ein PCR-Produkt distinkter Größe hervorbrachten, ließen sich alle Allelvarianten im homo- oder heterozygoten Zustand nachweisen (Abb. 21 B). Die Fragmentgrößen stimmen mit den berechneten Größen überein.

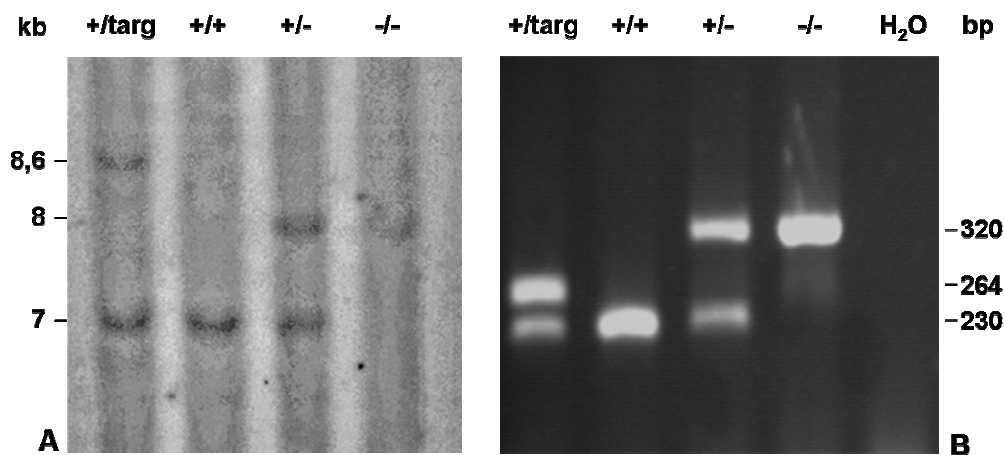


Abb. 21: *Cldn16*-Allelvarianten.

Dargestellt sind DNA-Fragmentgrößen nach *ScaI*-Verdau im Southern Blot, wie zur Verifizierung von ES-Zell-Klonen und Maus-Genotypen durchgeführt (A). PCR-Amplifikate auf DNA-Extrakten muriner Biopsien dienten der Genotypisierung (B).

4.1.3 Nachweis der Abwesenheit von Claudin-16

Mittels Southern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass auf genomischer Ebene ein Re-arrangement des Genlokus stattgefunden hat (Abb. 21 A). *ScaI*-verdaute Wildtyp-DNA wies unter Verwendung der in Abb.11 angezeigten Sonde eine Bande von 8 kb auf. Korrekt getargetete ES-Zell-Klone wurden durch das Vorliegen einer zusätzlichen Bande von 8,6 kb identifiziert. Das Knockout-Allel hat eine Fragmentgröße von 7 kb. Diese Anordnung erlaubt die Unterscheidung aller drei Allelvarianten und dient als Nachweis für die erfolgreiche Deletion des Exons 2 im *Cldn16* Knockout-Tier. Auf cDNA-Ebene konnte nachgewiesen werden, dass der Exon 2-codierende Abschnitt nicht transkribiert wird. Eine detaillierte Analyse des Transkripts wies ein Produkt bestehend aus der codierenden Sequenz der Exons 1, 3, 4 und 5 auf, welches als Ganzes in *Cldn16*^{-/-} Mäusen entsteht, aber durch ein entstehendes Stop-Codon nach Exon 1 nicht weiter translatiert wird (Abb. 22 A, B).

Die Abwesenheit von Claudin-16 konnte zusätzlich mittels Western Blot auf murinem Nierenmaterial bestätigt werden. (Abb. 22 C).

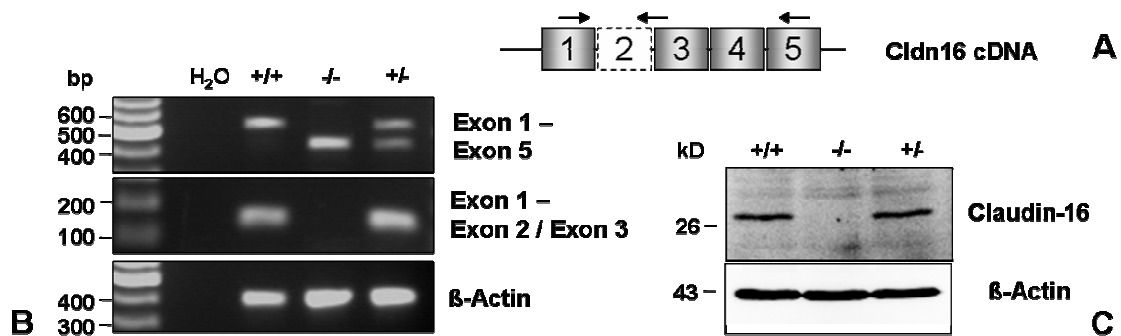


Abb. 22: Nachweis der Elimination von Claudin-16.

Schematische Darstellung von *Cldn16* cDNA samt Lage der Detektionsprimer. Das deletierte Exon 2 ist als gestricheltes Kästchen gekennzeichnet (A). Mittels PCR auf cDNA-Präparationen ließ sich im *Cldn16*^{-/-}-Tier ein verkürztes Transkript nachweisen, dem Exon 2 fehlt (B). Im Western Blot war Claudin-16 in renalen Gewebepreparationen (Auftrag jeweils 10 µg) von *Cldn16*^{+/+}- und *Cldn16*^{+/-}-Mäusen detektierbar, jedoch nicht in *Cldn16*^{-/-}-Mäusen (C). Als Kontrolle diente der Nachweis von β-Actin.

4.2 *Cldn16* - Physiologische Grundcharakterisierung

4.2.1 Vitalität und Fruchtbarkeit

Zunächst wurde untersucht, ob *Cldn16* Knockout Mäuse lebensfähig sind, oder sonstige Auffälligkeiten hinsichtlich Größe, Gewicht oder Organbeschaffenheit zu ihren Wurfgeschwistern aufweisen. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Nachkommen hinsichtlich des Genotyps den Mendelschen Regeln entsprechend verteilen. Des Weiteren konnten weder auffällige Entwicklungsverzögerungen noch signifikante Unterschiede im Gewicht festgestellt werden (siehe 7.4). Die Organe der *Cldn16*^{-/-}-Tiere waren makroskopisch voll ausgebildet. Sowohl Männchen als auch Weibchen mit Claudin-16-Defizienz erwiesen sich als fertil.

4.2.2 Untersuchung des Ionenstoffwechsels

Zunächst wurden Elektrolytparameter im Claudin-16-defizienten Tier analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass *Cldn16*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine auffällige Störung des Ionenstoffwechsels aufweisen: Die Serum-Magnesiumspiegel sind in Claudin-16-defizienten Mäusen um ca. 15 % erniedrigt.

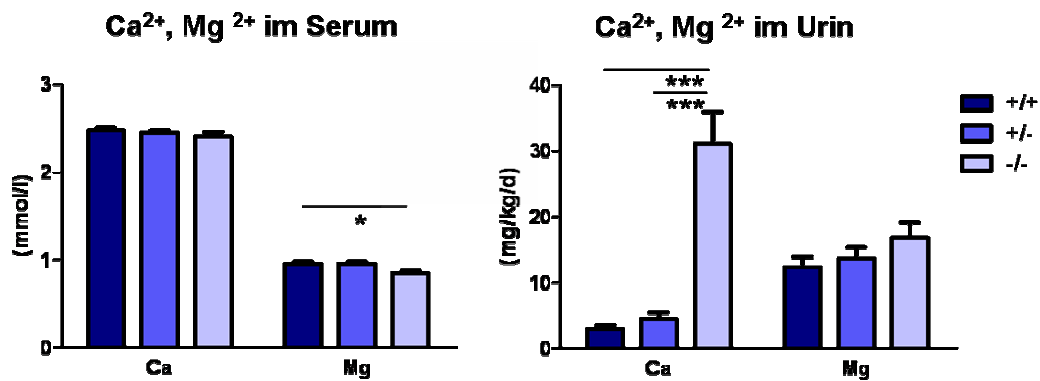


Abb. 23: *Cldn16* – Homöostase bivalenter Kationen I.

Dargestellt sind Kalzium- und Magnesiumspiegel in juvenilen (6 - 7 Wochen alt) *Cldn16*^{+/+}, *Cldn16*^{+/-}, *Cldn16*^{-/-}-Tieren.

Die Ausscheidung von Kalzium im Urin ist etwa fünffach erhöht (Abb. 23). Diese Befunde entsprechen den klinischen Parametern von FHHNC-Patienten. Auch das Ausmaß der Elektrolytverschiebung ist mit den Werten von Patienten vergleichbar. Weitere Elektrolytparameter zeigten keine signifikanten Abweichungen bei Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren (siehe 7.4). Die gesammelten Urinvolumina unterschieden sich nicht voneinander.

Vergleichende Elektrolytanalysen in murinen Neonaten (P4) konnten eine vermehrte Ausscheidung von Kalzium im Urin bestätigen. Eine Hypomagnesiämie liegt in diesem Alter jedoch nicht vor (Abb. 24). Somit deutet sich an, dass der Phänotyp in frühen postnatalen Stadien nicht den Schweregrad annimmt, wie er in juvenilen Tieren beobachtet wurde. Diese Schlussfolgerung ist jedoch u.a. aufgrund der unterschiedlichen Technik der Probenentnahme nur bedingt aussagekräftig (siehe auch 5.2).

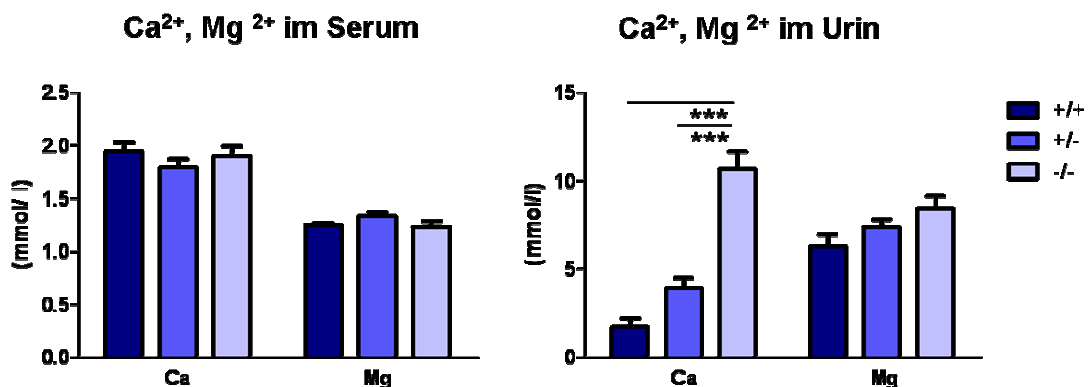


Abb. 24: *Cldn16* - Homöostase bivalenter Kationen II.

Dargestellt sind die Kalzium- und Magnesiumspiegel in neonatalem (P4) *Cldn16*^{+/+}, *Cldn16*^{+/-} bzw. *Cldn16*^{-/-}-Tieren.

4.2.3 Hormonell regulierte Kompensation des Salzverlustes

Durch die Imbalanz im Mineralstoffwechsel bei Claudin16-Defizienz liegt die Vermutung nahe, dass hormonelle Gegenregulationsmechanismen zum Tragen kommen, um auf die gestörte Kalzium- und Magnesium-Homöostase einzuwirken und den Serumspiegel an bivalenten Kationen konstant zu halten. Aus diesem Grund wurden Serumparameter distinkter Regulatoren des Mineralstoffwechsels untersucht: Das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon (PTH) wird als Antwort auf niedrige Spiegel von Kalzium, aber auch Magnesium, verstärkt freigesetzt. 1,25 Dihydroxy-Vitamin D3 (Calcitriol) ist die biologisch aktive Form des Vitamin D3 und wird in der Niere gebildet. Beide Hormone wirken auf verschiedene Organsysteme, welche der Speicherung (Knochen), bzw. der Wiederaufnahme / Exkretion (Darm, Niere) von Mineralstoffen dienen, und steuern somit die Bioverfügbarkeit von Kalzium und Magnesium. Entsprechend der Erwartungen zeigte sich bei *Cldn16*^{-/-}-Mäusen eine um Faktor 2 erhöhte Konzentration an Parathormon im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen, sowie eine signifikante Erhöhung der Serum-Calcitriolspiegel (Abb. 25). *Cldn16*^{+/-}-Tiere weisen tendenziell erhöhte Calcitriolwerte auf, ergeben jedoch keinen signifikant intermediären Phänotyp. Mit den Hormonanalysen konnte somit eine hormonelle Kompensation der gestörten Kationenhomöostase in diesem Tiermodell nachgewiesen werden.

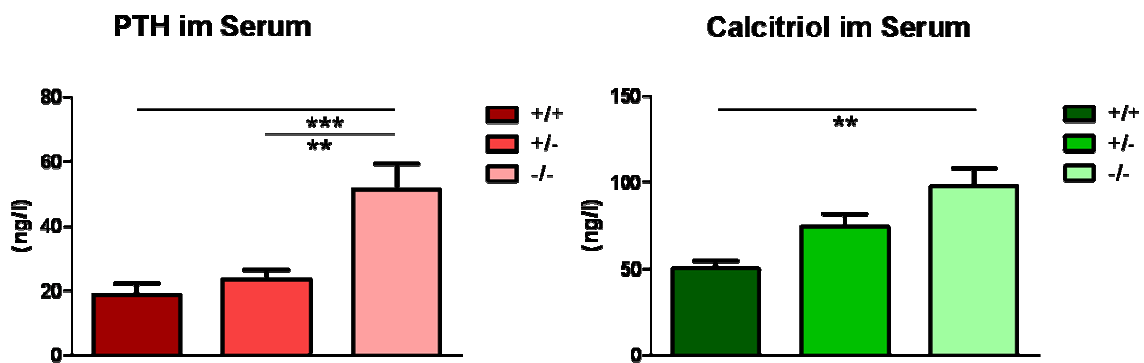


Abb. 25: *Cldn16* – endokrinologische Parameter.

Ermittelt wurden Serumspiegel an PTH und Calcitriol in juvenilen (6 - 7 Wochen alten) *Cldn16*^{+/+}, *Cldn16*^{+/-}-bzw. *Cldn16*^{-/-}-Tieren.

4.2.4 Untersuchungen auf Nephrokalzinose

Fortschreitender renaler Kalziumverlust kann zu einer Akkumulation von Kalziumkristallen, vorzugsweise entlang der medullären Tubulussegmente, führen. Humane FHHNC-Patienten erreichen meist in Folge von Nierenverkalkungen bis zur zweiten Lebensdekade das Stadium terminalen Nierenversagens. Mittels von Kossa-Färbung wurden Nierenschnitte von 5 bzw. 11 Monate alten *Cldn16*-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypkontrollen hinsichtlich des Vorliegens von tubulären Verkalkungspro-

zessen untersucht. Es konnten weder im Wildtyp- noch im Knockouttier Auffälligkeiten hinsichtlich derartiger Kristallisationsprozesse gefunden werden (Abb. 26). Somit ist davon auszugehen, dass Claudin-16-defiziente Mäuse trotz Hyperkalziurie keine Kalzifizierungsprozesse der Niere aufweisen.

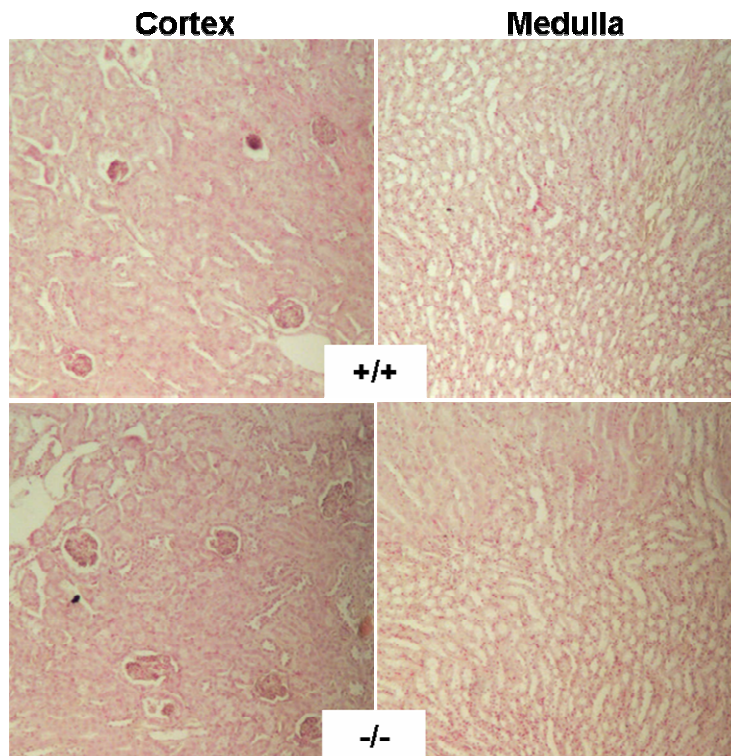


Abb. 26: *Cldn16* – renale Histologie.

Dargestellt ist eine von Kossa-Färbung histologischer Nierenpräparate von adulten (11 Monate alten) *Cldn16*^{+/+}-bzw. *Cldn16*^{-/-}-Tieren. (5x Vergrößerung, gegengefärbt mit 1 % Neutralrot-Lösung).

Es wurde daher eine Analyse des pH-Wertes im Urin vorgenommen, da renale Mechanismen der Azidifizierung und Alkalisierung einen Einfluss auf die Ausbildung von Nierenverkalkungen haben können. Dabei zeigten sich signifikant niedrigere pH-Werte in der Gruppe der *Cldn16*-Knockout-Tiere (Abb. 27). Dieser Befund legt nahe, dass bei diesen Tieren ein veränderter Säure-Base-Haushalt in der Niere vorliegt, welcher möglicherweise als Kompensationsmechanismus zum Tragen kommt (s. 5.2).

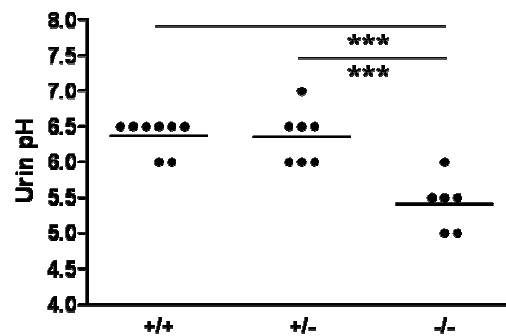


Abb. 27: *Cldn16* – Azidifizierung des Urins.

Aufgetragen sind pH-Werte muriner Urinproben von juvenilen *Cldn16*^{+/+}, *Cldn16*^{+/-}, *Cldn16*^{-/-}-Tieren. Der Mittelwert jeder Gruppe ist durch eine horizontale Linie ersichtlich.

4.2.5 Transepitheliale Messungen an isolierten, perfundierten TAL-Segmenten

Unter Einbeziehung der AG Bleich, Institut für Physiologie der Universität Kiel, wurden elektrophysiologische Messungen an präparierten Tubulussegmenten durchgeführt. Auf diese Weise sollten physiologische Daten zum parazellulären Ionentransport im TAL unter Claudin-16-Defizienz erhalten werden (siehe 7.3). Dieser Ansatz verfolgt somit die Untersuchung möglicher Modifikationen auf der Ebene der epithelialen Integrität bzw. des Zell-Zell-Kontaktes und ergänzt somit den erhaltenen Datensatz aus *in vivo*-Untersuchungen.

In einer ersten Untersuchungsreihe mit Tubuluspräparationen aus 9 - 10 Wochen alten *Cldn16^{+/+}*, *Cldn16^{+/-}* und *Cldn16^{-/-}*-Mäusen wurden für die einwertigen Ionen Natrium und Lithium unveränderte Ionenpermeabilitäten gemessen. Diese Befunde sprechen dafür, dass die semipermeable TJ im TAL unter Claudin-16-Defizienz keinen maßgeblichen Einfluss auf die parazelluläre Resorption dieser Ionenspezies hat.

Für Magnesium konnte jedoch eine signifikant reduzierte Permeabilität im *Cldn16*^{-/-}-Tier festgestellt werden (siehe auch Tab. 14). *Cldn16*^{+/-}-Mäuse zeigten bei allen Untersuchungen keine Unterschiede zu Wildtyp-Kontrolltieren.

In einem zweiten Untersuchungsansatz mit 17 Wochen alten *Cldn16^{+/-}* und *Cldn16^{-/-}*-Tieren konnte die beobachtete selektive Impermeabilität für Magnesium unter Abwesenheit von Claudin-16 bestätigt werden. Zusätzlich wurde ebendiese reduzierte Permeabilität auch für Kalziumionen beobachtet (siehe auch Tab. 14).

Diese Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass es unter Abwesenheit von Claudin-16 im TAL zu einer Veränderung der Transportspezifität des Tight Junction-Komplexes kommt, welcher weiterhin eine Passage von einwertigen Ionen zulässt, jedoch für die zweiwertigen Ionen Kalzium und Magnesium nur eingeschränkt permeabel ist. Welche genauen Mechanismen dieser selektiven Impermeabilität zugrunde

liegen, bleibt jedoch in weitergehenden elektrophysiologischen Untersuchungen genauer aufzuklären.

4.3 Transkriptomanalysen zur Aufklärung von renalen molekularen Mechanismen

4.3.1 Microarray-Expressionsanalysen

Um zu überprüfen, inwieweit die gestörte Kalzium- und Magnesium-Homöostase einen Einfluss auf kompensatorische Mechanismen in der Niere hat, wurden Transkriptomanalysen von renalem Gewebe durchgeführt. Hierzu wurden Nierenpräparate von 8 Wochen alten weiblichen Mäusen untersucht. Den Organen wurden nach Entnahme die Nierenpole entfernt. Es wurden jeweils Gruppen à 4 Tiere von *Cldn16*^{+/+} und *Cldn16*^{-/-}-Mäusen, sowie 3 *Cldn16*^{+/-}-Tieren, mit Hilfe von Microarray-Chips (Illumina) analysiert. Auf diesen Chips sind ca. 45000 Transkripte immobilisiert, welche den Großteil der vorhandenen murinen Gene, teils in mehrfacher Ausführung, abdecken, und zudem auch bisher nicht zugeordnete Transkripte aus Datenbanken beinhalten. Somit erlauben es diese Analysen, auch bis dato nicht oder unzureichend beschriebene Gene in die Analysen mit einzubeziehen. Auf mehreren Ebenen wird zudem die Validität der erhaltenen Daten garantiert (s. 3.6.2). Insgesamt konnten 1695 Transkripte als signifikant hochreguliert bestätigt werden, 1824 Transkripte waren signifikant niedriger exprimiert ($p < 0,05$).

Eine detaillierte Auflistung aller differenziell regulierten Gene kann der Online-Datenbank GEO unter der Zugangsnummer GSE19961 entnommen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19961>). Ausgewählte Gene, hauptsächlich mit Funktion im renalen Elektrolythaushalt, sind nachfolgend in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: *Cldn16* - Transkriptomanalysen.

Übersicht ausgewählter Gene mit differenzieller Regulation und / oder Relevanz in der renalen Ionenhomöostase. Pfeile deuten signifikant differenzielle Hochregulation im Knockout-Tier versus Kontrolltier um Faktor ≥ 2 (↑↑↑), $\geq 1,5$ (↑↑) bzw. $\geq 1,2$ (↑) an.

Entrez Gene ID	Chip ID	Alias / Protein	Expression		differenz. Regulation (%)	p-Wert	Aufgabenbereich
			<i>Cldn16</i> ^{+/+} ± SD	<i>Cldn16</i> ^{-/-} ± SD			
277753	MGC25972	Cyp4a12	208,36 ± 61,63	458,46 ± 87,69	2,20 ↑↑↑	0,0034 (**)	Cytochrom P450 Familie,
20541	SLC8A1	Ncx1	686,46 ± 89,71	1431,61 ± 190,85	2,09 ↑↑↑	0,0004 (***)	distaltubulärer Na ⁺ /Ca ²⁺ - Austauscher
17242	MDK	Midkine	1055,03 ± 110,35	1752,30 ± 257,93	1,66 ↑↑	0,0025 (**)	Differenzierungs- und Wachstumsfaktor
12846	COMT	Catechol-o-Methyltransferase	3595,63 ± 164,51	5406,57 ± 354,00	1,50 ↑↑	0,0001 (***)	Katecholamin-Syntheseweg
64292	PTGES	Prostaglandin E2-Synthase	116,18 ± 10,16	173,04 ± 14,14	1,49 ↑	0,0006 (***)	Prostaglandinmetabolismus
224079	9330174J19RIK	Atp13a4	102,08 ± 16,48	151,72 ± 18,08	1,49 ↑	0,0067 (**)	membranständige ATPase
225997	TRPM6	Trpm6	319,12 ± 14,20	473,85 ± 71,29	1,48 ↑	0,0053 (**)	distaltubulärer Mg ²⁺ - Kanal
20497	SLC12A3	Ncc	3439,08 ± 588,13	4992,84 ± 773,28	1,45 ↑	0,0186 (*)	distaltubulärer NaCl-Transporter
69847	PRKWNK4	with-no-Lysine-Kinase 4	2256,12 ± 290,36	3260,73 ± 606,77	1,45 ↑	0,0244 (*)	Signalweg der distaltubulären Na ⁺ - Homöostase
12309	S100G	Calbindin-9K	586,11 ± 116,61	822,70 ± 95,91	1,40 ↑	0,0202 (*)	intrazellulärer Ca ²⁺ -Transport
232341	PRKWNK1	with-no-Lysine-Kinase 1	1459,50 ± 167,90	1932,05 ± 316,67	1,32 ↑	0,0387 (*)	Signalweg der distaltubulären Na ⁺ - Homöostase
94219	CNNM2	CyclinM2	793,29 ± 81,94	1036,08 ± 92,26	1,31 ↑	0,0077 (**)	Mg ²⁺ - sensitiver Transporter
16591	KL	Klotho	4533,87 ± 583,35	5835,55 ± 773,12	1,29 ↑	0,0361 (*)	u.a. Regulator in renaler Ca ²⁺ -Homöostase
194352	TRPV5	Trpv5	245,93 ± 21,31	306,66 ± 15,88	1,25 ↑	0,0038 (**)	distaltubulärer Ca ²⁺ - Kanal
20278	SCNN1G	ENaC-γ Untereinheit	1885,43 ± 85,02	2336,66 ± 243,21	1,24 ↑	0,0128 (*)	renal exprimierter Na ⁺ -Kanal
20277	SCNN1B	ENaC-β Untereinheit	890,02 ± 38,74	1024,82 ± 39,41	1,15	0,0028 (**)	renal exprimierter Na ⁺ -Kanal
64177	TRPV6	Trpv6	72,08 ± 2,48	79,88 ± 2,04	1,11	0,0028 (**)	intestinaler und renaler Ca ²⁺ - Kanal
20276	SCNN1A	ENaC-α Untereinheit	782,99 ± 155,45	808,69 ± 77,85	1,03	0,7775 (n.s.)	renal exprimierter Na ⁺ -Kanal
53416	STK39	Spak	354,70 ± 35,76	321,62 ± 23,41	0,91	0,1726 (n.s.)	Signalweg der distaltubulären Na ⁺ - Homöostase
20495	SLC12A1	Nkcc2	159,86 ± 43,23	116,07 ± 24,03	0,73	0,1269 (n.s.)	Na ⁺ /Cl ⁻ /K ⁺ -Resorption im TAL

Es wurde im Folgenden eine Einteilung der als differenziell reguliert ausgewiesenen Transkripte hinsichtlich ihres Funktionsbereiches vorgenommen.

(i) Gene, welche mit dem renalen Kalziumstoffwechsel assoziiert sind, wurden in der ersten Gruppe zusammengefasst. Darunter fallen Transkripte für membranständige Transportproteine wie die apikal lokalisierten Kalziumkanäle *Trpv5* und *Trpv6* sowie *Slc8A1*, für den basolateralen Natrium-Kalzium-Antiporter *Ncx1* codierend. Zusätzlich wurde mit S100g ein Transkript des in murinem Gewebe gefundenen intrazellulären kalziumbindenden Proteins Calbindin-D9K identifiziert. Das Membranprotein Klotho, welches u.a. eine Rolle im Kalziumphosphathaushalt des Körpers spielt und im proximalen als auch distalen Nephron exprimiert ist, weist ebenfalls eine erhöhte Transkription auf.

(ii) *Trpm6*, ein apikaler Magnesiumkanal in Zellen des distalen Tubulus, ist in Claudin-16-defizienten Mäusen um knapp 50% höher exprimiert. Dieser Befund deutet somit an, dass auch die Magnesiumresorption im distalen Nephron reguliert ist. Transzelluläre Magnesiumtransporter der Niere sind nach derzeitigem Erkenntnisstand noch nicht eingehend erforscht. Weder ist ein intrazelluläres, magnesiumbindendes Transportprotein beschrieben worden, noch ist der basolaterale Extrusionsmechanismus des Magnesiums bekannt. Somit konnte keine gezielte Suche nach möglicherweise differenziell regulierten Kandidatengenen erfolgen. Auf die Transkripte *Atp13A4* und *Cnnm2*, welchen möglicherweise eine Rolle im renalen Magnesiumstoffwechsel zugeordnet werden kann, wird in Abschnitt 5.2.1 ausführlicher eingegangen.

(iii) Transkripte, welche mit der distaltubulären Natrium-Homöostase assoziiert sind, wurden in Gruppe 3 zusammengefasst. Zum einen wurde das Transkript *Slc12a3*, codierend für den apikalen Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC), gefunden. Zum anderen konnte mit *Wnk4* auch ein Gen des Wnk-Signalweges identifiziert werden.

(iv) Transkripte, welche nicht oder nur indirekt einer der drei erstgenannten Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden in einer vierten Gruppe zusammengefasst. Als Signifikanz-Schwellenwert wurde für diese Gruppe abweichend $p < 0,001$ festgelegt. Im Einzelnen handelt es sich um COMT (Catechol-o-Methyltransferase) und *Cyp4a12* (20-HETE Synthase), welche u.a. im Zusammenhang mit Hypertonie erforscht sind. *Ptges*, codierend für das Enzym Prostaglandin-E-Synthase (PGES), zeigte im Knock-out-Tier eine Hochregulierung um etwa 50 %. PGES wurde u.a. beschrieben mit der Regulation des tubulären transzellulären Kalziumtransportes (Baal et al, 1996). Eine Metabolitbestimmung in Urinproben von *Cldn16*^{+/+} bzw. *Cldn16*^{-/-}-Tieren ergab jedoch, dass das Syntheseprodukt dieses Enzyms, Prostaglandin-E2 (PGE2), unter Claudin-16-Defizienz nicht vermehrt ausgeschieden wurde (siehe auch 7.4). Differenziell regu-

lierte Transkripte wurden zudem von Marchel Stuver mittels qPCR-Analysen bestätigt (Abb. 28).

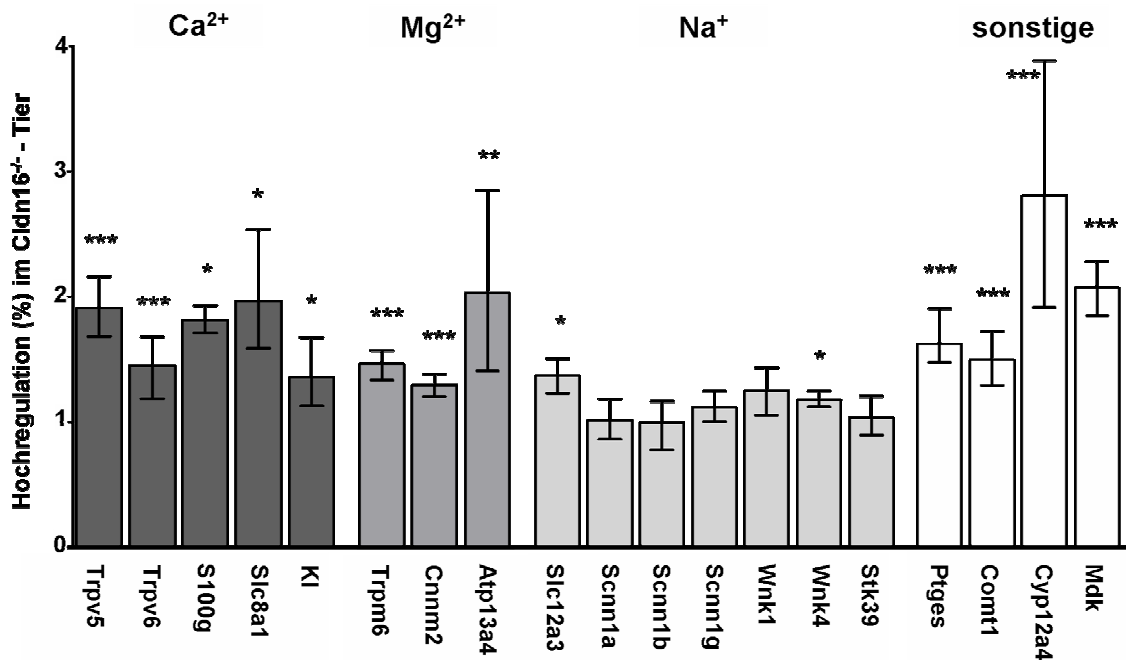


Abb. 28: *Cldn16* - Konfirmationen differenziell regulierter Gene mittels qPCR.

Dargestellt sind ausgewählte Gene renaler Transport- oder Regulationsprozesse des Ca²⁺ (dunkelgrau), des Mg²⁺ (grau), des Na⁺ (hellgrau) sowie sonstiger Stoffwechselwege (weiß). Aufgetragen mit Standardfehler (SE) nach Taylor-Algorithmus.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Transkriptomanalysen renale gegenregulatorische Mechanismen des Kalziumstoffwechsels, des Magnesiumstoffwechsels, sowie der Natrium- und Blutdruckhomöostase identifiziert werden. Von besonderer Relevanz sind dabei die Funde zweier induzierter Transkripte mit putativer Funktion im Magnesiumstoffwechsel, welche den bekannten Satz an renalen Magnesiumtransportproteinen komplettieren könnten. Funktionelle und molekulare Analysen der Kandidatenproteine Atp13A4 und Cyclin M2 stehen derzeit an und werden in Abschnitt 5.2.1 näher erörtert.

4.4 Knockout des murinen Gens *Cldn10*

4.4.1 Generierung des *Cldn10*-Targetingkonstrukts

Das *Targeting* des *Cldn10*-Gens wurde weitestgehend in Analogie zur Manipulation am *Cldn16*-Lokus geplant und durchgeführt. Das murine *Cldn10*-Gen ist auf Chromosom 14 lokalisiert und codiert für 6 Exons. Als Besonderheit weist das Gen 2 alternative Exons 1 auf, welche für 2 Haupt-Isoformen (jeweils 5 Exons) codieren. Auch in anderen Spezies treten diese als Claudin-10a und Claudin-10b beschriebenen Isoformen auf und wurden erstmalig von van Itallie *et al.* beschrieben [Van Itallie et al., 2006] und später von Günzel *et al.* funktionell charakterisiert [Günzel et al., 2009]. Aus dieser Arbeit geht eine renale Expression beider Isoformen hervor, so dass zu erwarten ist, dass sie eine funktionelle Aufgabe in der Niere erfüllen. Es wurde demzufolge eine Knock-out-Strategie gewählt, bei welcher Exon 2 und das räumlich benachbarte Exon 3 deletiert wurden (Abb. 29), um die Expression beider Isoformen zu unterbinden.

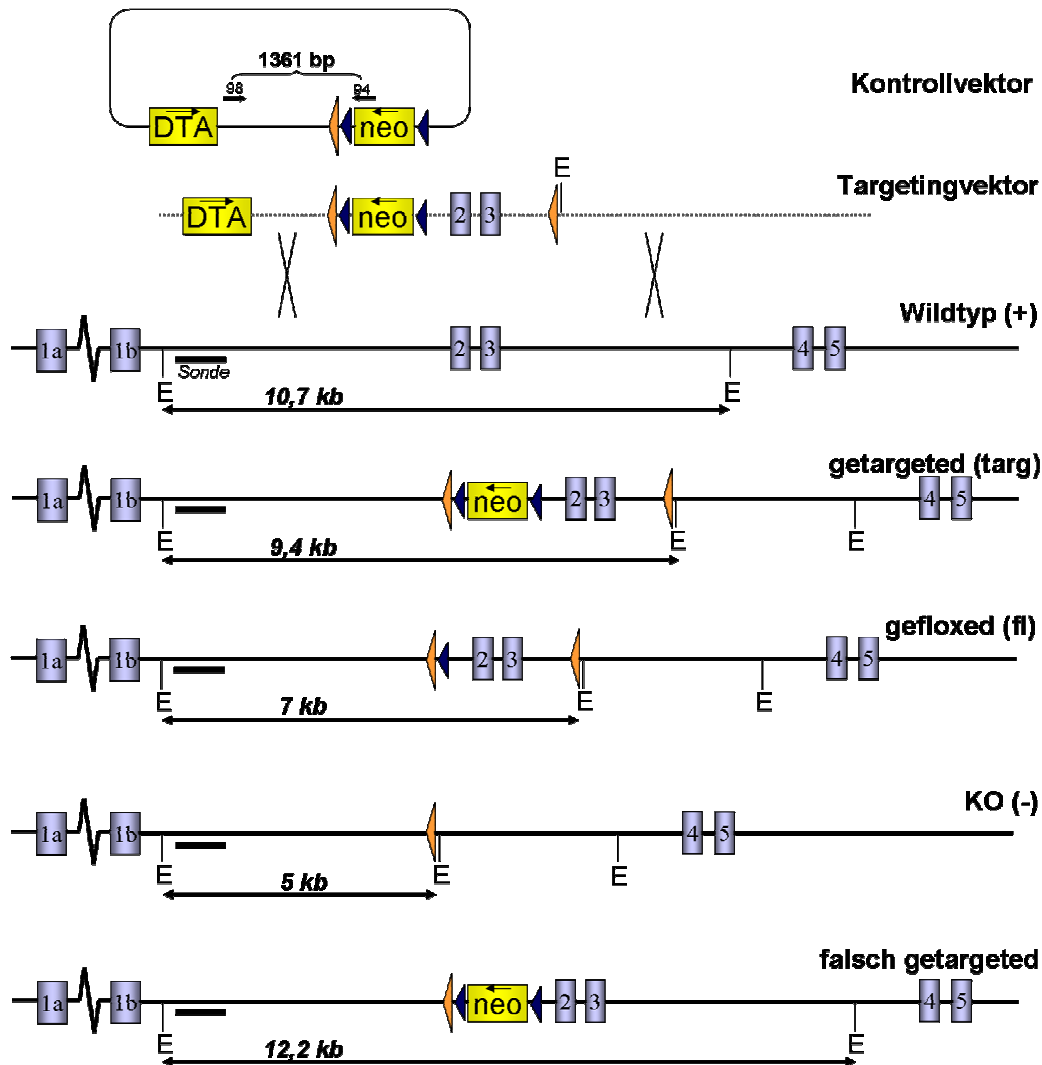


Abb. 29: Targetingstrategie und Allelvarianten des murinen *Cldn10*-Gens.

Sonde, Fragmentgrößen, Exons, Selektionsmarker und Exzisionssequenzen sind analog zu Abb. 16 eingezeichnet, EcoRV-Restriktionsschnittstellen sind entsprechend markiert (E).

Das Erstellen des Knockout-Konstruktes inklusive Einbau der Selektionsmarker und Verifizierung der codierenden Abschnitte erfolgte analog zu 4.1. *Downstream* des dritten Exons wurde über eine Mutagenese-PCR eine weitere loxP-site in Kombination mit einer zusätzlichen EcoRV-Restriktionsschnittstelle ins Konstrukt eingebracht. Letztere ermöglicht es, homologe Rekombinanden direkt im Southern Blot hinsichtlich der An- oder Abwesenheit der loxP-Sequenz zu unterscheiden.

Unter Ausnutzung zweier genetischer Technologiesysteme aus Exzisionssequenz und Rekombinationsenzym wurde der Knockout-Vektor als Konstrukt zum konditionellen *Targeting* des *Cldn10*-Lokus erstellt:

(i) Das FLP / FRT-System wurde dazu genutzt, durch Einbau von Exzisionssequenzen (FRT) eine nachfolgende, enzymvermittelte Exzision (FLP) des Selektionsmarkers neo zu ermöglichen. Dieser Schritt bildet die Grundlage zum Erstellen der geflochten, konditionellen *Cldn10*-Linie.

(ii) Das analog zu (i) funktionierende Cre / lox-System ermöglicht es, direkt einen codierenden Abschnitt des Zielgens zu deletieren und somit eine Mauslinie mit vollständiger Elimination von Claudin-10 zu generieren.

Diese parallele Herangehensweise bot sich im Falle des *Cldn10*-Gens an: Da zu Beginn der Arbeiten keine *in vivo*-Daten zur Funktion des Proteins vorlagen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Gendeletion zur Letalität oder Unfruchtbarkeit der Tiere führt. In diesem Fall kann das konditionelle Mausmodell für spezielle Analysen Verwendung finden, wie etwa ontogenetische Defizienzstudien oder ein organspezifischer *Cldn10*-Knockout.

4.4.2 *Cldn10*: ES-Zell-Targeting und Erstellung der transgenen Linie

Das *Targeting* des *Cldn10*-Lokus erfolgte mit einer Erfolgsquote von 6 positiv getesteten Klonen aus 550 *gescreenten* ES-Zellen, welche mittels Kontroll-PCR (siehe auch Abb. 16, 3.2.18) identifiziert wurden. Die zusätzliche loxP-Sequenz wurde für zwei Klone mittels Southern Blot-Analysen bestätigt (siehe auch Abb. 32). Präparierte ES-Zellen dieser Klone wurden erfolgreich für eine Blastocysteninjektion zum Erstellen zweier konditioneller Mauslinien eingesetzt. Die chimären Nachkommen wurden einmal mit C57 BL/6-Tieren rückverpaart. In einem nachfolgenden Zuchtschritt wurde ein Teil der Nachkommen (F1) mit einem transgenen Mausstamm verpaart, welcher eine ubiquitäre Expression eines Cre-Transgens aufweist [Schwenk et al., 1995].

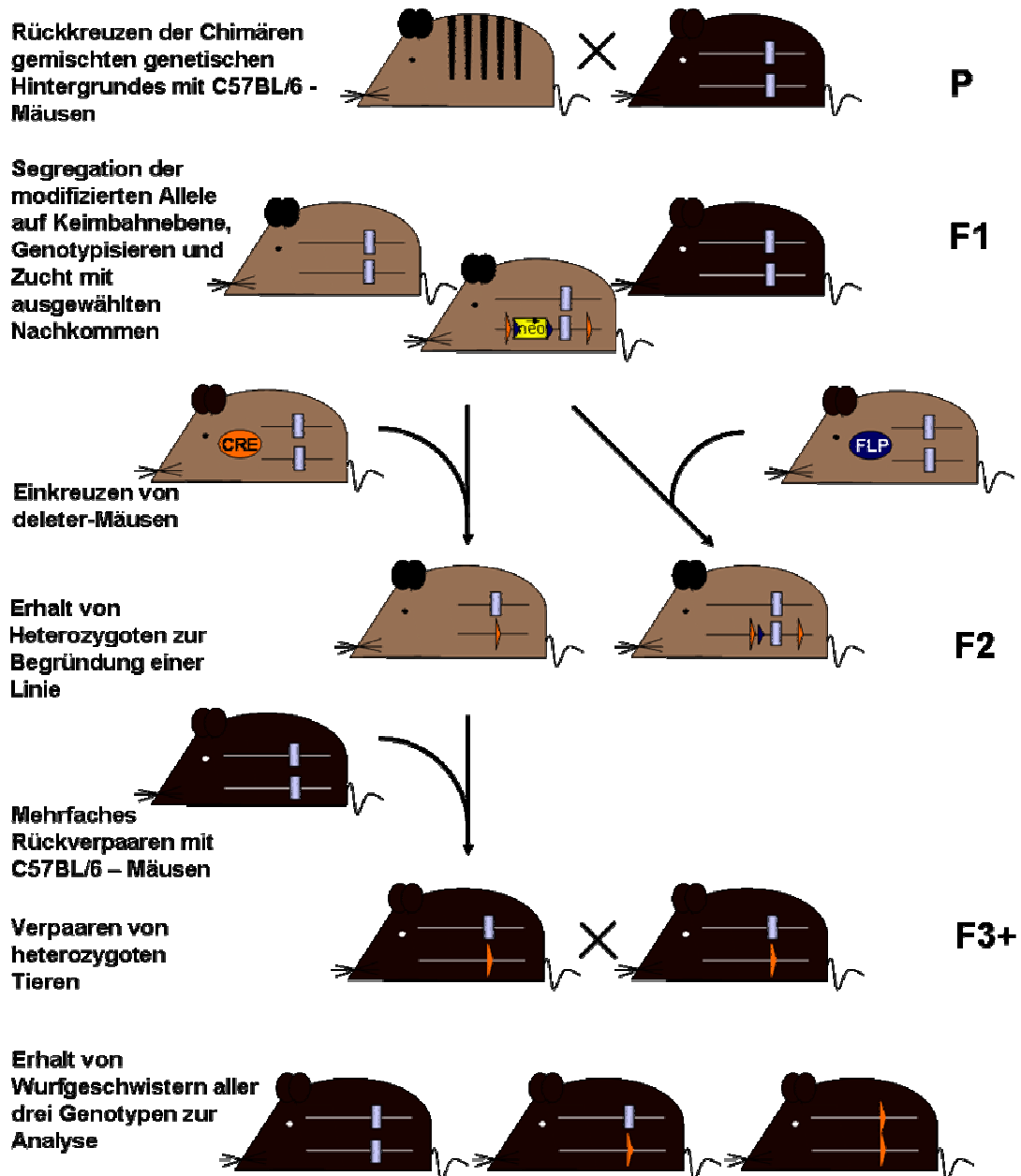


Abb. 30: Zuchtschema zur Etablierung einer konventionellen bzw. konditionellen Knock-out-Linie.

Chimäre Tiere (agouti / schwarz) wurden einmalig mit Wildtypen des Stammes C57 BL/6 (schwarz) rückverpaart. Agoutifarbene Nachkommen zeigten die Keimbahngängigkeit der ES-Zellen an. Durch Einkreuzen von transgenen Cre *deleter*-Mäusen bzw. FLP *deleter*-Mäusen (angedeutet mit CRE und FLP in Ovalen) wurde auf Keimbahnebene eine Deletion der flankierten Exons respektive des Neomycinresistenmarkers erreicht. Weitere Details der Züchtungen sind der Abbildung zu entnehmen. Selektionsmarker, Exon- und Exzisionssequenzen sind farbig in Analogie zu Abb. 16 dargestellt.

Auf diese Weise wurde analog zu Punkt 4.1.2 die Knockout-Linie gezüchtet (Abb. 30, links). Ein weiterer Teil der Nachkommen (F1) wurde mit FLP-deleter-Mäusen [Rodriguez et al., 2000] gekreuzt (Abb. 30, rechts). Diese transgene Linie weist eine ubiquitäre Expression der FLP-Rekombinase auf und ermöglicht so in diesem Kreuzungsschritt unter Beibehaltung des geflochten *Cldn10*-Gens die Exzision des Neomy-

cinresistenzmarkers auf Keimbahnebene. Nachkommen der Claudin-10-Zuchtlinien wurden mittels Genotypisierungs-PCR unter Vorlage von Schwanzspitzenbiopsien hinsichtlich ihrer Allelzustände untersucht (Abb. 31). Die Transgene Cre und FLP wurden ebenfalls mittels PCR nachgewiesen.

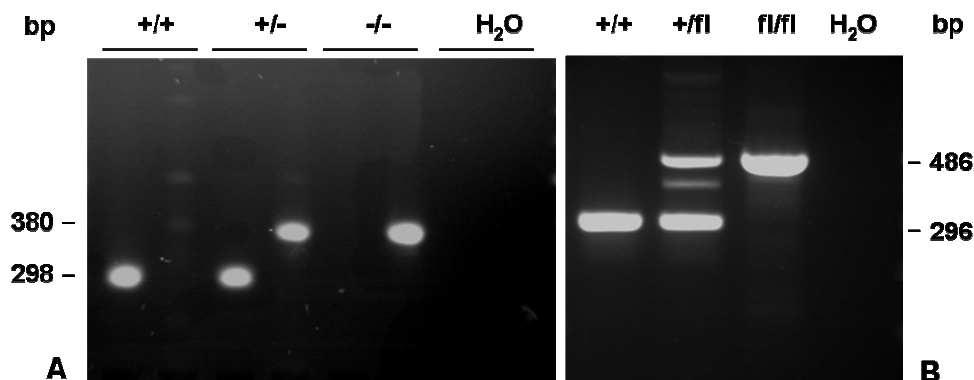


Abb. 31: *Cldn10* - Genotypisierung muriner Nachkommen.

Mittels PCR auf DNA-Extrakten muriner Biopsien konnten alle Genotypen nachgewiesen werden: *Cldn10*^{+/+}, *Cldn10*^{+/-} und *Cldn10*^{-/-}-Tiere der konventionellen *Cldn10*-Zuchtlinie (A, 2 Laufspuren / Analyse), sowie *Cldn10*^{+/+}, *Cldn10*^{+/-} und *Cldn10*^{fl/fl}-Tiere der konditionellen *Cldn10*-Zuchtlinie (B).

4.4.3 Nachweis der Abwesenheit von Claudin-10

Im Southern Blot konnte das Rearrangement am murinen *Cldn10*-Lokus nachgewiesen werden (Abb. 32 A). Nach EcoRV-Verdau wies das Wildtyp-Allel eine Fragmentgröße von 10,7 kb auf, während das *Targeting* des Lokus in einem Banden-Shift auf 9,4 kb (unter Integration der loxP-Sequenz) bzw. 12,2 kb (ohne Integration der loxP-Sequenz) resultierte (Abb. 32 B). Zur Bestätigung der Genotypen muriner Nachkommen wurden zusätzlich ausgewählte Tiere einer Genotypisierung mittels Southern Blot unterzogen.

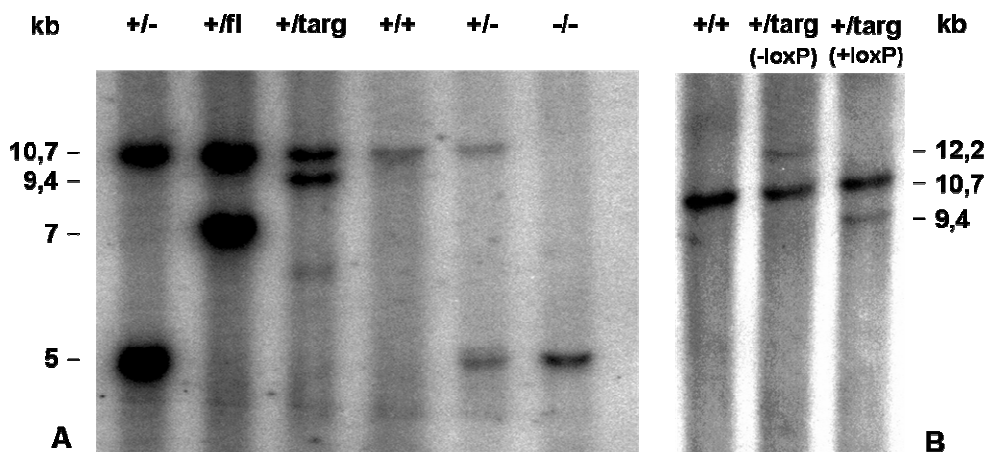


Abb. 32: *Cldn10* - Allelvarianten im Southern Blot.

Dargestellt sind DNA-Fragmentgrößen im EcoRV-Verdau zur Bestätigung des Genotyps muriner Nachkommen (A) sowie zum Nachweis der Integration einer loxP-Sequenz auf ES-Zell-Ebene (B). Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Neben den oben angegebenen Bandengrößen, wies das gefloxtete Allel eine Fragmentgröße von 7 kb, das Knockout-Allel eine Größe von 5 kb auf. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den zuvor theoretisch berechneten Fragmentgrößen.

Zusätzlich konnte im Rahmen der immunologischen Detektion von Claudin-10 mittels Western Blot bestätigt werden, dass das Protein im Knockout-Tier abwesend ist. (Abb. 33). Der verwendete Antikörper erkennt alle Isoformen des Claudin-10.

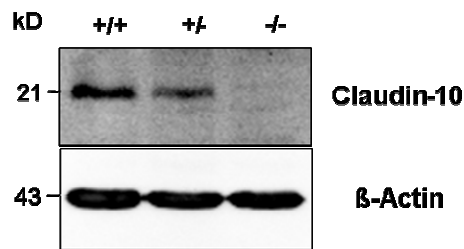


Abb. 33: Nachweis der Elimination von Claudin-10.

Im Western Blot auf Nierenpräparationen neonataler *Cldn10^{+/+}*, *Cldn10^{+/-}*, *Cldn10^{-/-}*-Wurfgeschwister (Auftrag jeweils 5 µg Gesamtprotein) konnte das Fehlen des Proteins im Claudin-10-defizienten Tier bestätigt werden. Als Kontrolle diente der Nachweis von β-Actin.

4.5 *Cldn10* - Physiologische Grundcharakterisierung

4.5.1 Vitalität und Fruchtbarkeit

Claudin-10-defiziente Mäuse (*Cldn10^{-/-}*) wurden durch Verpaarung von heterozygoten (*Cldn10^{+/-}*) Elterntieren erhalten. Neugeborene *Cldn10^{-/-}*-Mäuse zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Körperlänge, Gewicht oder makroskopischer Auffälligkeiten (Abb. 34). Knockout-Tiere fielen entsprechend der 2. Mendelschen Regel mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 25 % zu 50 % heterozygoter und 25 % Wildtyp-Wurfgeschwister (signifikante Genotypverteilung nach Chi-Quadrat-Test, siehe 7.4). Ab dem ersten Lebenstag zeigte sich jedoch eine stark erhöhte Mortalität der Claudin10-defizienten Neonaten. Aus diesem Grund wurden sämtliche Untersuchungen an neonatalen *Cldn10*-Knockout-Mäusen durchgeführt. Kein Knockout-Tier überlebte den Tag P2. Aufgrund des statistischen Auftretens von Knockout-Tieren an P1 ist ferner davon auszugehen, dass diese Tiere nicht bereits *in utero* eine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität aufweisen. Die Letalität dürfte demzufolge im Zusammenhang mit der postnatalen Überlebensfähigkeit stehen, nicht etwa mit schweren anatomisch-morphologischen Beeinträchtigungen, die zum Abort führen.

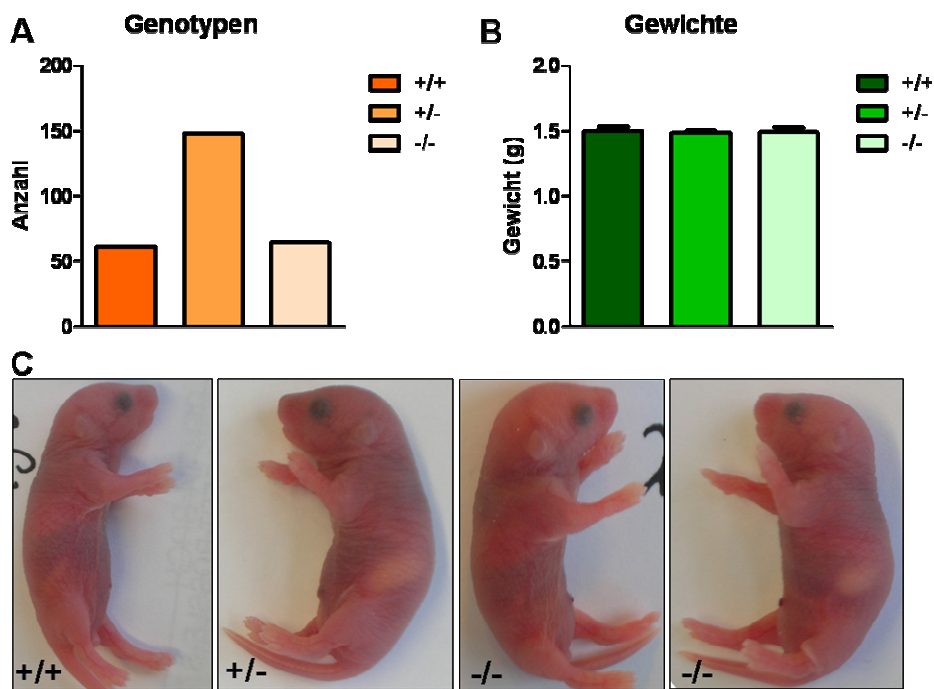


Abb. 34: *Cldn10*^{-/-} - Mäuse an Lebenstag 1 (P1).

Genotypverteilung der Nachkommen aus Verpaarungen zweier Heterozygoter (A), Gewichte von *Cldn10*^{+/+}, *Cldn10*^{+/-}, *Cldn10*^{-/-} -Neonaten (B), sowie Erscheinungsbild der Jungtiere (C).

Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass die Funktionsfähigkeit eines oder mehrerer Organe betroffen ist, welche unmittelbar nach der Geburt für die Lebensfähigkeit von essenzieller Bedeutung sind. Im Rahmen der Analysen wurden nachfolgend zwei Organe, die Niere und die Lunge, hinsichtlich funktioneller und morphologischer Auffälligkeiten untersucht.

4.5.2 Renale Funktion - Elektrolyte

Zunächst wurden Claudin-10-defiziente Tiere hinsichtlich ihrer Nierenfunktion analysiert. Elektrolytbestimmungen in Serum und Urin lassen eine Aussage über den Ionenhaushalt zu und ermöglichen eine Abschätzung der tubulären Resorption. Aufgrund der geringen Probenvolumina, die von Neonaten zu gewinnen sind, erfolgte eine Analyse ausgewählter Ionenspezies. Funktionelle Daten aus *in vitro*-Experimenten deuten auf eine Funktion von Claudin-10a als Anionenpore, von Claudin-10b als Kationenpore hin. Es wurde demzufolge eine Bestimmung von Kalzium, Magnesium, Natrium und Chlorid durchgeführt (Abb. 35). Diese Analysen erfolgten in Kooperation mit der AG Willnow, MDC Berlin.

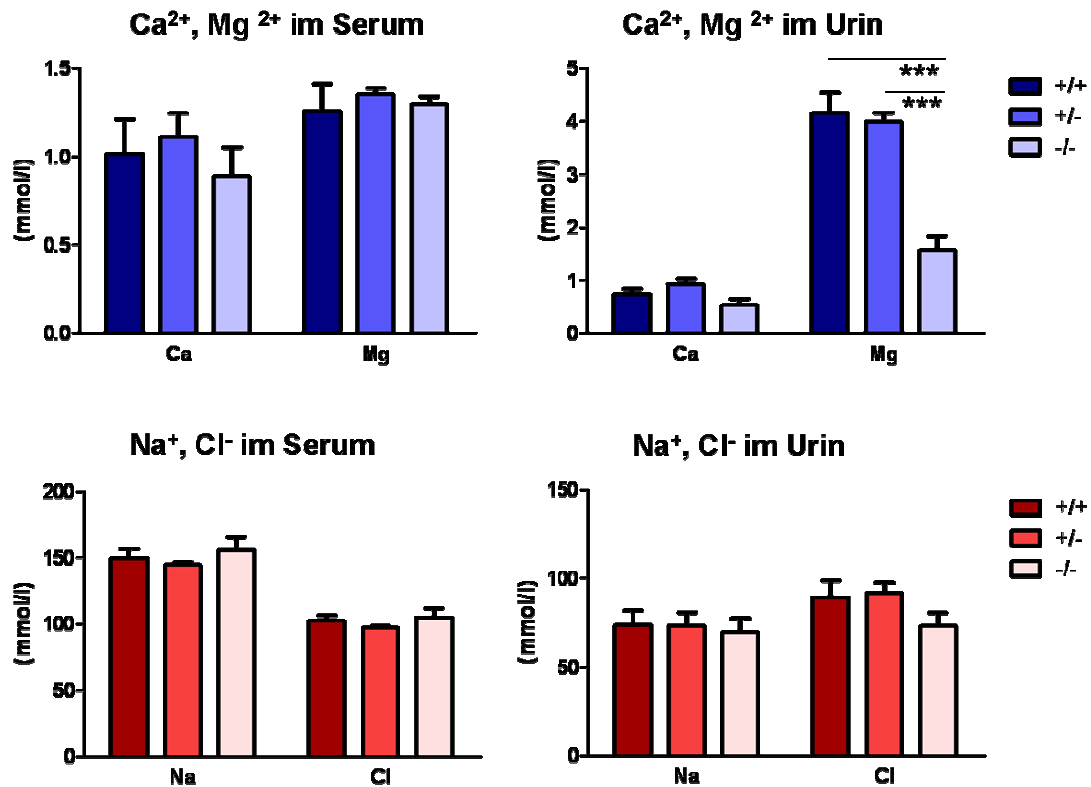


Abb. 35: *Cldn10* – Ionenhomöostase.

Dargestellt sind Serum- und Urinkonzentrationen ausgewählter Elektrolyte in neonatalen *Cldn10*^{+/+}, *Cldn10*^{+/-}, *Cldn10*^{-/-}-Mäusen (P1).

Die Elektrolytbestimmung in den Serumproben ergab keine signifikanten Änderungen unter Claudin-10-Defizienz. Die ermittelten Konzentrationen lagen im Vergleich zu Daten aus juvenilen Tieren im Normbereich und zeigten eine geringe Spannbreite. Die Analyse der Urinproben zeigte, dass im *Cldn10*^{-/-}-Tier Kalzium, Natrium und Chlorid unverändert, Magnesium dagegen stark vermindert ausgeschieden wurde. Dieser Befund deutet auf einen veränderten Magnesiumstoffwechsel im *Cldn10*-Knockout-Tier hin. Eine abschließende Einschätzung, ob es sich um einen Absorptionsdefekt (gastrointestinale Beeinträchtigung) oder einen Reabsorptionsdefekt (renale Beeinträchtigung) handelt, kann anhand der erhaltenen Datensätze nicht getroffen werden. Fortführende Untersuchungen werden möglicherweise weitere Aufschlüsse liefern.

4.5.3 Renale Morphologie - Histologien der Niere

Nierenquerschnitte von *Cldn10*-Knockout-Mäusen wurden mittels HE-Übersichtsfärbung hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten analysiert. Die Präparate wiesen anatomisch normal ausgebildetes Nierengewebe auf: Im Knockout- wie im Kontrolltier ließ sich eine Separation kortikaler und medullärer Areale ausmachen. Die Anzahl der Glomeruli unterschieden sich nicht. Des Weiteren waren keine pathologischen Veränderungen, wie etwa fibrotische oder Entzündungsprozesse, zu beobachten (Abb. 36).

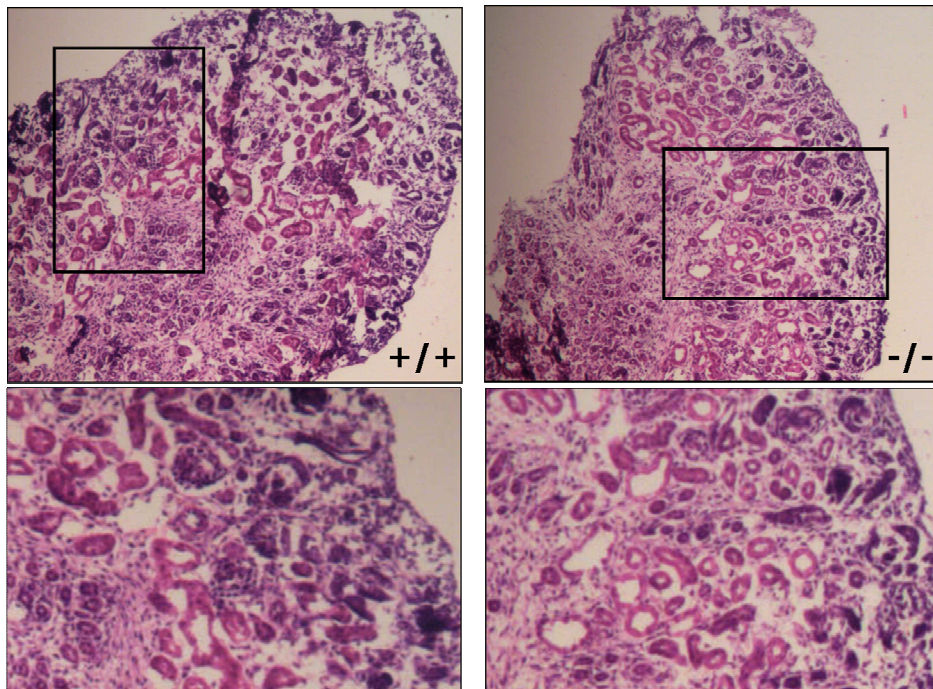


Abb. 36: *Cldn10* – renale Histologie.

Abgebildet ist eine HE-Färbung an Nierenquerschnitten muriner *Cldn10*^{+/+} und *Cldn10*^{-/-} Neonaten. (5x Vergrößerung, sowie 2x Zoom eines ausgewählten Abschnittes).

Des Weiteren erfolgten immunhistologische Untersuchungen an renalem Gewebquerschnitten Claudin-10-defizienter Mäuse (Abb. 37). Vergleichend mit ZO-1 als Tight Junction-Marker sollte im Kontrolltier die zelluläre Lokalisation von Claudin-10 untersucht werden, im Knockout dessen Abwesenheit bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Claudin-10 nicht vollständig mit ZO-1 kolokalisiert, sondern auch in zellulären Kompartimenten nachzuweisen ist.

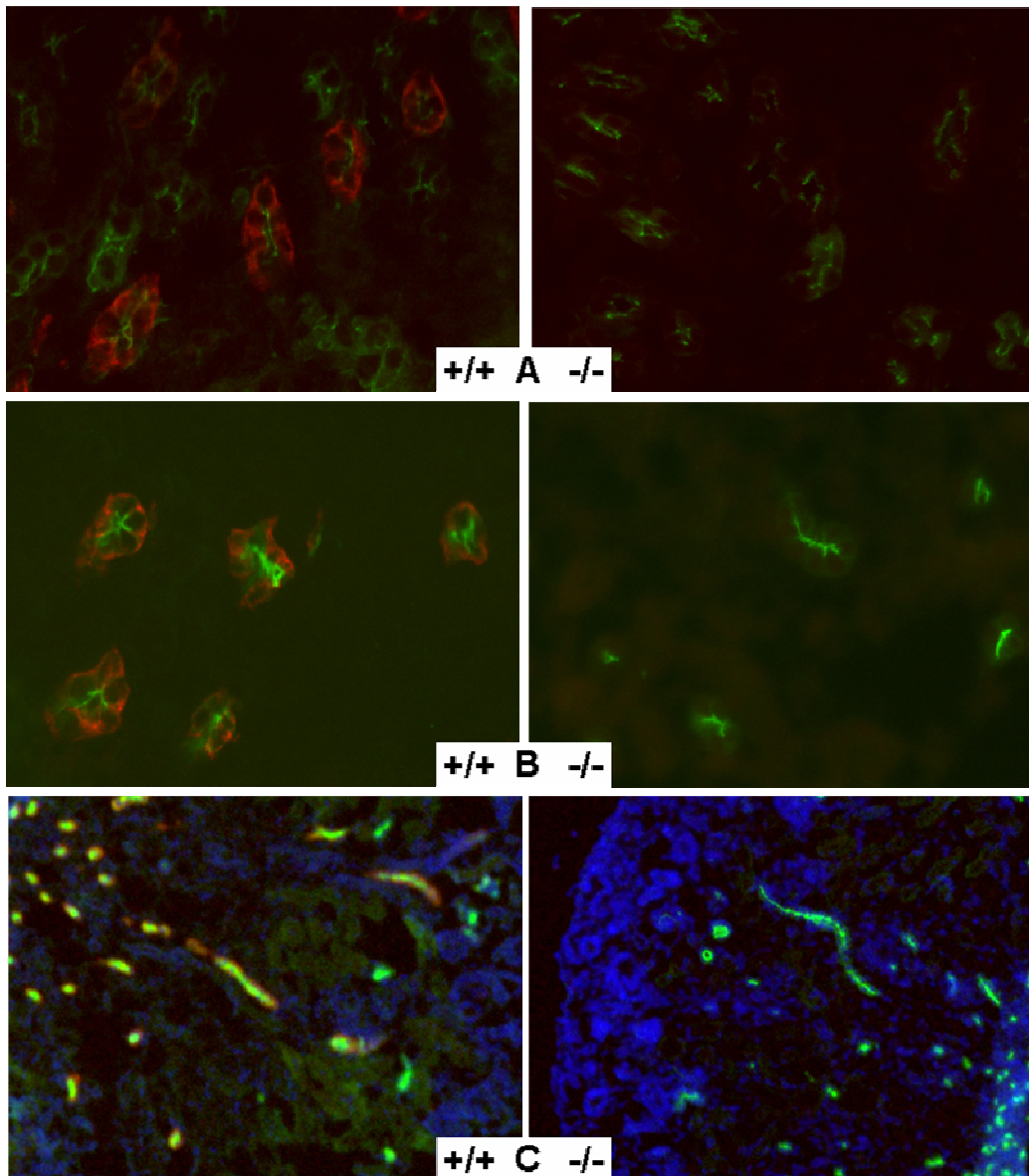


Abb. 37: *Cldn10* - Immunfluoreszenzfärbungen an renalem Gewebe.

Kofärbung von Claudin-10 und ZO-1 in der äußeren Medulla (A, 40x Vergrößerung). Kofärbung von Claudin-10 und NKCC2 in der Medulla (B, 40x Vergrößerung), sowie im sagittalen Nierenquerschnitt zur Übersicht (C, 10x Vergrößerung). Claudin-10 ist rot, die Markerproteine ZO-1 bzw. NKCC2 sind grün angefärbt. Der Kernfarbstoff DAPI ist in blau dargestellt.

Zusätzlich wurde eine Kofärbung mit Tubulussegmentmarkern durchgeführt. Im Wildtyp tier zeigte sich, dass Claudin-10 mit dem TAL-Marker NKCC2 koexprimiert ist, und aufgrund dessen apikaler Lokalisation keine Kolo kalisation erfolgte. Im Knockout-Tier war, wie schon bei der Kofärbung mit ZO-1, kein Signal für Claudin-10 nachweisbar. Beide Markerproteine wiesen unter Claudin-10-Verlust keine auffällige Änderung in Expressionsrate und Lokalisation auf.

4.5.4 Pulmonale Funktion – Lungenparameter

Neben der Niere wurde die Lunge als mögliches, von Claudin-10-Defizienz primär betroffenes Organ einer eingehenden Analyse unterzogen. Claudin-10-Expression konnte im Alveolarepithel als auch in Clarazellen nachgewiesen werden [Van Itallie et al., 2006 ; Zemke et al., 2009]. Eine Aufgabe der Alveolen besteht in der Produktion von Surfactant, einem Gemisch aus Proteinen und Phospholipiden. Es ist von Bedeutung in der Auskleidung von Alveolen und in der Kontrolle des Gasaustausches zwischen Alveolarraum und Blutgefäßen. Clarazellen machen mit 50 – 80 % den Hauptanteil von Zellen in murinem bronchiolärem Lungengewebe aus [Pack et al., 1981].

Unsere Theorie bestand im Folgenden aus der Annahme, dass Claudin-10-Defizienz in einer Störung der Integrität des bronchioalveolären Epithels resultiert. Nachfolgend beschriebene Konsequenzen können spekuliert werden:

- (i) Die Freisetzung von Surfactant findet nur unzureichend statt, die Alveolen können sich nicht frei entfalten und der Gasaustausch ist gehindert. Dies resultiert in einem Atemnotsyndrom ähnlich des bei prämaturn geborenen Säuglingen beschriebenen respiratorischen Distress-Syndroms (RDS).
- (ii) Die postnatale Resorption von verbliebenem Fruchtwasser in der Lunge ist erschwert.
- (iii) Der Lungenepithelschaden führt zur Infiltration von Flüssigkeit und somit zur Ausbildung eines Lungenödems.

Claudin-10-defiziente Mäuse wurden folglich hinsichtlich ausgewählter Lungenparameter untersucht. Eine starke respiratorische Beeinträchtigung sollte sich in einer veränderten Atmungsrate, vorzugsweise einer Hyperventilation, äußern. Wassereinlagerungen in der Lunge sollten zu einer deutlich erhöhten Ratio von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht führen [Hummler et al., 1996].

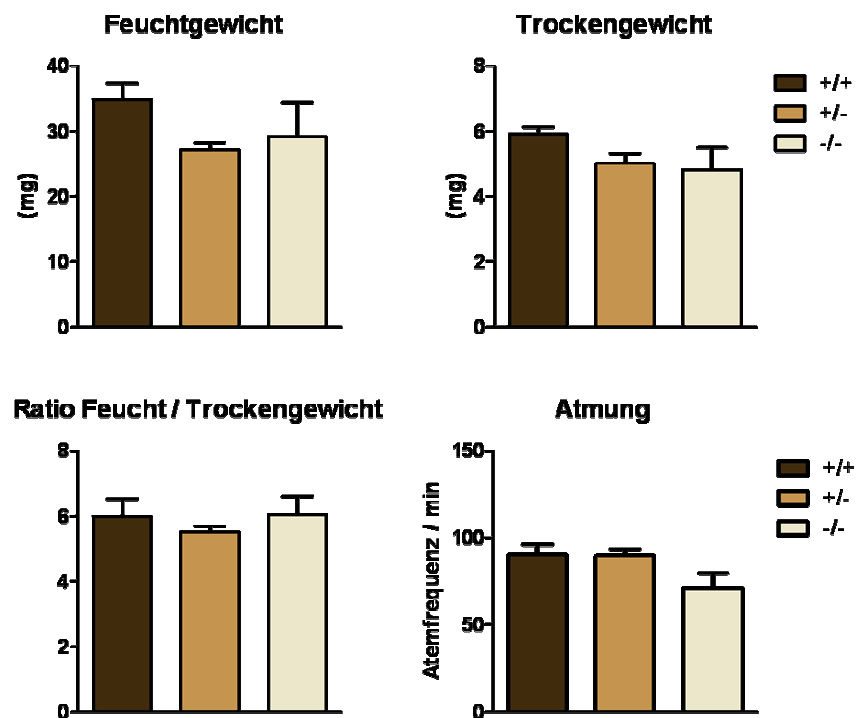


Abb. 38: *Cldn10* - Lungenparameter

Abgebildet sind physiologische Parameter von *Cldn10*^{+/+}-, *Cldn10*^{+/-}- und *Cldn10*^{-/-}-Mäusen: Lungenfeuchtgewicht, Lungentrockengewicht, das Verhältnis Feucht / Trockengewicht, sowie die Atemfrequenz.

Eine signifikante Änderung der Atemfrequenz konnte bei *Cldn10*^{-/-}- Neonaten, verglichen mit Wildtyp-Wurfgeschwistern, nicht festgestellt werden. Ebenso ergaben die Ratios aus Feucht- und Trockengewicht keine Auffälligkeiten zwischen den Analysegruppen. Auch deutete sich im Vergleich des Gesamtlungengewichtes keine Änderung der Gewebemasse an (Abb. 38). Eine Analyse von Blutgasparametern zur Komplettierung der Untersuchungen konnte aufgrund von unzureichender Geräteausstattung sowie Schwierigkeiten bei der Sammlung von geeigneten Blutproben bzw. Probenvolumina nicht durchgeführt werden.

4.5.5 Pulmonale Morphologie – Histologien der Lunge

Lungengewebe muriner *Cldn10*^{+/+}- bzw. *Cldn10*^{-/-}-Neonaten wurden schließlich mittels HE- Übersichts-färbung vergleichend untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene Gewebepreparationstechniken angewendet: Untersucht wurde unbehandeltes, direkt zur Fixierung entnommenes Lungengewebe (kollabierter Zustand), sowie mittels Injektion von Fixierungsreagenz geweitetes Lungengewebe (entfalteter, nativer Zustand) [Xia et al., 1999]. Bei der Begutachtung der histologischen Präparate konnten keine Unterschiede in beiden Analysegruppen festgestellt werden (Abb. 39). Insbesondere

die Untersuchung entfalteter Lungenpräparate verdeutlichte, dass die künstliche Injektion von Fixierungsreagenz in neonatales Gewebe aufgrund der geringen Volumina nur sehr eingeschränkt zuverlässig auswertbare, reproduzierbare Daten liefert: Die Lungenflügel weisen in beiden Analysegruppen einen variablen Entfaltungsgrad auf. Lymphozyteninfiltrationen wurden in den Analysegruppen in 64 % (*Cldn10*^{+/+}) bzw. 55 % (*Cldn10*^{-/-}) der histologischen Präparate beobachtet (n = 11).

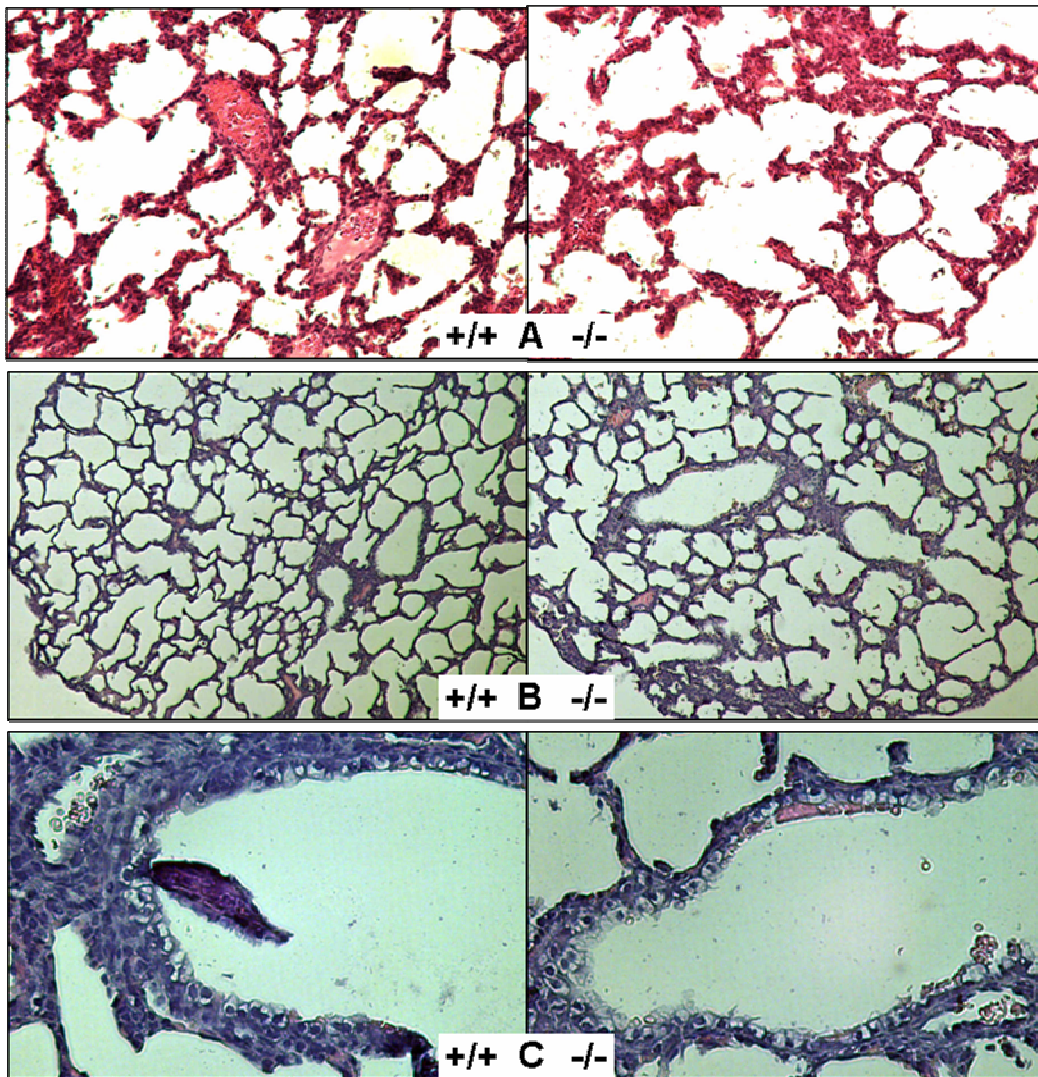


Abb. 39: *Cldn10* – pulmonale Histologie.

HE-Übersichtsfärbungen von Cryoschnitt-Präparaten kollabierter Lungen (A, 10x Vergrößerung), von Paraffinschnitten entfalteter Lungen (B, 5x Vergrößerung), sowie Darstellung eines Bronchiusepithels (C, 20x Vergrößerung).

Aus den erhaltenen Daten ergibt sich somit kein eindeutiges Anzeichen auf eine pulmonale Funktionsstörung im *Cldn10*^{-/-}-Tier. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung des Phänotyps wird der Schwerpunkt zukünftig auf Studien zur organspezifischen Claudin-10-Defizienz gelegt (siehe auch 5.3.1). Diese Analysen waren jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr als Teil dieser Arbeit geplant.

5 Diskussion

Mitglieder der Claudin-Familie erfüllen eine Aufgabe im Erhalt der Integrität und Permeabilität von Epithelien, und sind somit essenziell für die Funktionsfähigkeit von Organen. Im Rahmen meiner Arbeit wurden genetisch manipulierte Mäuse generiert, welche eine Defizienz für Claudin-16 und -10 aufweisen. *Cldn16*^{-/-}-Tiere zeigten einen renalen Verlust von Kalzium und Magnesium. *Cldn10*^{-/-}-Mäuse erwiesen sich als postnatal letal und zeigten Auffälligkeiten in der Magnesium-Homöostase. An dieser Stelle möchte ich zunächst auf das gewählte Modellsystem und die Versuchsstrategie eingehen, um im Anschluss die erhaltenen Ergebnisse zu diskutieren.

5.1 Tiermodelle zur Evaluation der *in vivo*-Funktion von Claudinen

5.1.1 Wahl des geeigneten Modells

Das Forschungsziel unserer Arbeitsgruppe ist die Analyse der Claudine des TALs hinsichtlich ihrer renalen Funktion. In diesem Nephronsegment sind die Claudine 3, 10, 11, 16 und 19 exprimiert. Mehrere Untersuchungsansätze bieten sich für deren funktionelle Charakterisierung an, deren Vor- und Nachteile ich kurz erläutern werde.

Der erste Schritt zur Funktionsaufklärung von Proteinen besteht in der Regel darin, mittels geeigneter Zellkultursysteme *in vitro*-Daten zu sammeln. Das können im Fall von Transmembranproteinen der Claudin-Familie etwa Ionenleitfähigkeiten, Messungen zur Barrierefunktion oder auch die Analyse von möglichen Bindungspartnern sein. Ansätze zu Defizienzuntersuchungen lassen sich mit Hilfe interferierender RNA im Zellkultursystem untersuchen. Die Claudine des TAL sind jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand nur sehr eingeschränkt *in vitro* darstellbar, da es keine Zellkulturen gibt, die aus dem TAL isoliert wurden. Bisherige Analysen renaler Claudine fanden daher in der Regel an transfizierten Zellkulturen anderer Nierenareale, etwa MDCK-Zellen, statt. MDCK-Zellen entstammen Hundenieren (*Madine Darby Canine Kidney*) und werden aufgrund ihrer Heterogenität in verschiedenen Subzelllinien geführt, weisen aber generell Charakteristika und Expressionseigenschaften ähnlich den Zellen des distalen Tubulus auf [Arthur, 2000]. Solche Versuchsbedingungen erlauben daher nur bedingt Rückschlüsse auf die Zustände im TAL.

Unser Ansatz bestand daher in der Generierung von murinen konditionellen Defizienzmodellen. Die Maus bietet sich aufgrund der technischen Möglichkeiten des Gen-Knockouts als Modellorganismus an, in anderen Spezies ist diese Technologie noch nicht möglich bzw. in den Anfängen der Entwicklung [Abbott, 2004 ; Buehr et al., 2008]. Durch den Knockout von *Cldn16* bzw. von *Cldn10* wurden somit im Rahmen dieser Arbeit *in vivo*-Modelle generiert, welche es ermöglichen, den Effekt der Eliminierung

eines einzelnen Claudins auf den Gesamtorganismus zu untersuchen. Dieser Untersuchungsansatz wurde im Fall der Claudin-16-Mauslinie ergänzt durch *ex vivo*-Analysen am isolierten Tubulus. Der Vorteil dieses präparativ sehr aufwändigen Analysesystems besteht darin, dass man gezielt Ionenströme in definierten Tubulusabschnitten untersuchen kann, ohne Störeffekte bzw. Signalüberlagerungen von umliegenden Nephronsegmenten zu erhalten. Das Gesamtsystem Niere mit möglichen nachgelagerten Regulationsmechanismen wird mit dieser Technologie jedoch nicht erfasst.

Bei der Generierung von gendefizienten Mauslinien ist generell zu beachten, dass die Elimination eines Gens Auswirkungen auf die Wirkung und Funktion von anderen Mitgliedern der entsprechenden Proteinfamilie haben kann: Für Mitglieder der Claudin-Familie kann spekuliert werden, dass einzelne Claudin-Spezies bis zu einem gewissen Grad eine Redundanz aufweisen, bzw. deren Fehlen durch andere Claudine kompensiert werden kann. Beispielsweise wurde Claudin-2, obwohl in diversen Geweben exprimiert, im Tierdefizienzmodell mit einem renalen Phänotyp beschrieben [Muto et al., 2010]. Andererseits sind auch synergistische Wirkungen und spezifische Interaktionen von Claudinen beschrieben worden, wie etwa das Beispiel von Claudin-16 und Claudin-19 zeigt: *In vitro* ließen sich beide Claudine als Bindungs- bzw. funktionelle Partner in der Porenbildung identifizieren. Im *Cldn19*-Knockdown-Tiermodell wurde das Assemblieren von Claudin-16 in der Tight Junction verhindert. Ein umgekehrter Effekt wurde in *Cldn16*-Knockdown-Mäusen beobachtet [Hou et al., 2009]. Interpretiert wurde diese Beobachtung mit einem möglichen posttranslationalen Effekt: Das korrekte *Targeting* der Interaktionspartner bedingt, dass auch beide exprimiert werden. Beim Fehlen der einen essenziellen Komponente erweist sich auch die andere als infunktionell. Diese Beobachtung könnte den ähnlichen Phänotyp beider Claudin-Mausmutanten erklären, und ebenso das Krankheitsbild humaner Mutationsträger begründen.

5.1.2 Targetingstrategie des *Cldn16*

Für das spezifisch im TAL exprimierte Claudin-16 ist zu postulieren, dass die Niere das primär betroffene Organ ist. Zudem ist zu erwarten, dass sich Parallelen zur menschlichen Erkrankung mit Claudin-16-Defekt ergeben, und dass das Tiermodell somit im Anschluss an die Grundcharakterisierung für pharmakologische Studien eingesetzt werden kann, um einen klinischen Nutzen für Patienten zu ziehen.

Im humanen *CLDN16*-Gen sind unterschiedliche Punktmutationen beschrieben worden, die mit der Erkrankung FHHNC assoziiert sind. Sie finden sich sehr häufig im Bereich der extrazellulären Schleifen des Proteins, oder in den Transmembrandomänen [Kausalya et al., 2006]. Ein Großteil der Punktmutationen resultiert in einem Aminosäureaustausch. Dieser Zustand wird durch das erstellte Tiermodell somit nicht 100% wi-

dergespiegelt – die Targetingstrategien verfolgten jeweils den Verlust codierender Sequenzen, infolgedessen frühzeitig ein Stop-Codon für den Kettenabbruch und die Expression eines trunkierten Proteins sorgt. Von trunkierten sowie fehlgefalteten Proteinen ist im Allgemeinen auszugehen, dass sie intrazellulären Degradationsprozessen über das Proteasom unterliegen [Miller und Gordon, 2005]. Kausalya *et al.* gingen dieser Fragestellung in einer Transfektionsstudie nach: 21 Claudin-16-Mutanten, welche zuvor in Patienten beschrieben worden waren, wurden hinsichtlich ihres zellulären *Traffickings* untersucht. Es zeigte sich, dass alle trunkierten Proteine sowie ein Großteil der Proteine mit Aminosäureaustausch im Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Netzwerk oder in Lysosomen akkumulieren [Kausalya *et al.*, 2006]. Eine Retention des trunkierten Claudin-16 ist in diesem Tiermodell somit sehr wahrscheinlich.

Es bleibt dennoch zu spekulieren, ob die humanen Mutationen zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust führen. *In vitro*-Analysen sowie Patientenstudien legen nahe, dass der Ort der Genmutation unterschiedliche Auswirkungen auf die Zielfindung und mögliche Teilfunktionalität des mutierten Proteins hat: Arbeitsgruppeninterne Untersuchungen als auch Studien an größeren Patientenkohorten mit mutiertem *CLDN16* sprechen dafür, dass eine Korrelation zwischen Mutationsort und Schweregrad des Phänotyps besteht [Kausalya *et al.*, 2006 ; Konrad *et al.*, 2008 ; Müller *et al.*, 2006]. Die exakte Erfassung der Erkrankung mit allem Schweregradabstufungen ist daher gar nicht mit nur einem Tiermodell möglich. Eine Lösung wäre, einzelne *CLDN16*-Mutationen durch gezielten Knock-In in Mausmodellen zu simulieren. Die Gefahr besteht jedoch auch in diesem Fall, dass der murine Phänotyp von der menschlichen Erkrankung abweicht: So könnte z.B. aufgrund der leicht abgewandelten Aminosäuresequenz von humanem und murinem Claudin-16 die Tertiärstruktur des Proteins nahe der Mutationsstelle unterschiedlich ausgebildet sein. Ein und dieselbe Aminosäure könnte somit unterschiedlich stark exponiert daliegen, deren Austausch variable Effekte *in vivo* mit sich bringen. Aus diesem Grund erschien der klassische Weg über den Knockout eines Großteils codierender Sequenz der geeignete Ansatz, um einen Claudin-16-Funktionsverlust zu erreichen.

5.1.3 Targetingstrategie des *Cldn10*

Das murine *Cldn10*-Gen codiert für zwei Haupt-Isoformen, Claudin-10a und -10b, von denen zusätzlich aus Datenbanken unterschiedliche Spleißvarianten bekannt sind. Zu Beginn der Arbeiten war durch Expressionsanalysen bestätigt worden, dass alle Claudin-10-Varianten in renalem Gewebe exprimiert sind, folglich orientierte sich die Targetingstrategie daran, mit dem Knockout Exon 2 und 3 alle bekannten Varianten zu eliminieren. Ergebnisse aus der Charakterisierung von Claudin-10-defizienten Mäusen sind

nicht eindeutig einem Claudin-10-Subtyp zuzuordnen. Eine Erstellung von isoform-spezifischen Knockouts durch die Generierung von Claudin-10a- und Claudin-10b-Defizienzmodellen könnte weitere Einblicke in die Funktionalität von Claudin-10 liefern und ist als zukünftiges Projekt in Planung.

Es wurde außerdem versucht, isoform-spezifische Antikörper gegen die von Exon 1a und Exon 1b codierten Proteindomänen in einem Insektenzellkultursystem zu generieren. Auf diese Weise könnten tubulussegmentspezifische Expressionsanalysen durchgeführt werden, um die unterschiedliche Verteilung beider Isoformen entlang des Nephrons zu bestätigen. Expressionsvektoren mit codierenden Sequenzen konnten erfolgreich hergestellt und zur Zelltransfektion eingesetzt werden. Eine Expression des gewünschten Peptides hatte jedoch keinen Erfolg, es wurde eine interne Degradation des Peptides vermutet. Aus diesem Grund wurde das Projekt nicht fortgeführt.

Die *in vivo*-Rolle des Claudin-10 war zu Beginn der Arbeiten ungeklärt. Wie wichtig in diesem Fall strategische Planungen zur Art des Gantargetings sind, möchte ich nachfolgend erläutern: Wie bereits in Abschnitt 1.8 dargelegt, wurden bis dato für eine Reihe von menschlichen Claudin-assoziierten Erkrankungen Tiermodelle in Form von Knockout-Mäusen erstellt. Auch Claudin-Gene, die bisher nicht mit einer menschlichen Erkrankung assoziiert sind, wurden durch murine *in vivo*-Modelle einer Funktionsaufklärung unterzogen, wie zusammenfassend in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Publierte Claudin-Mausmodelle.

Gen	Mutation	Phänotyp	Referenz
<i>Cldn1</i>	KO	Transdermalen Wasserverlust, postnatal letal	[Furuse et al., 2002]
<i>Cldn2</i>	KO	Verminderte NaCl-Resorption im proximalen Tubulus	[Muto et al., 2010]
<i>Cldn5</i>	KO	Degradation der Blut-Hirn-Schranke, postnatal letal	[Nitta et al., 2003]
<i>Cldn6</i>	Transgen	Epidermisfehlfunktion, postnatal letal	[Turksen und Troy, 2002]
<i>Cldn7</i>	KO	Renaler Verlust von K ⁺ und Na ⁺ , Dehydratation	[Tatum et al., 2010]
<i>Cldn9</i>	ENU-KI	Taubheit	[Nakano et al., 2009]
<i>Cldn11</i>	KO	Verlangsamte Reizleitung, Hinterbeinschwäche, männliche Sterilität, Taubheit	[Gow et al., 2004 ; Gow et al., 1999]
<i>Cldn14</i>	KO	Taubheit	[Ben-Yosef et al., 2003]
<i>Cldn15</i>	KO	Dilatation des Dünndarms	[Tamura et al., 2008]
<i>Cldn16</i>	KD, KO	Hyperkalziurie, Hypomagnesiämie	[Hou et al., 2007 ; Will et al., 2010]
<i>Cldn19</i>	KD, KO	Neurologische Defekte bzw. renaler Verlust von Ca ²⁺ , Mg ²⁺	[Hou et al., 2009 ; Miyamoto et al., 2005]

KO = Knockout, KD = Knockdown, ENU KI = durch ENU-Mutagenese generierte Mutante, Transgen = Knock-In eines Transgens

Daraus ist ersichtlich, wie unterschiedlich sich Claudin-Fehlfunktionen hinsichtlich des Schweregrades und der betroffenen Organsysteme auswirkt. Insbesondere die Isoform Claudin-10b ist im Körper weit verbreitet exprimiert und es ist somit zu erwarten, dass neben der Niere auch andere Gewebe von einer Claudin-10-Defizienz betroffen sind. Ein möglicher renaler Phänotyp kann in solchen Fällen leicht überlagert werden. Aus diesem Grund wurde die Strategie der Erstellung von Claudin-10-defizienten Mäusen folgendermaßen gewählt:

- (i) In einem ersten Schritt wurde der Total-Knockout des Gens auf den Organismus untersucht, mit dem Schwerpunkt auf der Analyse eines möglichen renalen Phänotyps.
- (ii) Parallel dazu wurde die Linie als konditionelles Modell gezüchtet. Hier besteht die Option, in nachgelagerten Schritten ausschließlich einzelne Gewebe bzw. Gewebeabschnitte als Claudin-10-defizient zu generieren. Durch das Einkreuzen von ApoE-Cre-Mäusen [Leheste et al., 2003] kann man z.B. einen Total-Nieren-Knockout erhalten (siehe auch Abb. 12), oder eine TAL-spezifische Defizienz durch Einzucht einer Uromodulin-Cre-Linie (synonym: THP / Tamm-Horsfall-Protein) [Stricklett et al., 2003]. Solch umfangreiche Analysen waren allerdings nicht mehr als Teil dieser Arbeit geplant.

5.2 Phänotypisierung Claudin-16-defizienter Mäuse

Die Niere reguliert über glomeruläre Filtration und tubuläre Resorption die Salzhomöostase des Körpers. An den Resorptionsvorgängen sind Transportproteine beteiligt, welche sehr häufig unter hormoneller Regulation stehen. Neben transzellulären Transportprozessen kommt auch der parazellulären Resorption eine Bedeutung zu. Insbesondere Magnesium wird zu einem großen Anteil parazellulär resorbiert. Um nähere Einblicke in die molekularen Mechanismen der renalen Ionenhomöostase zu gewinnen, generierte ich im Rahmen meiner Arbeit ein Claudin-16-defizientes Mausmodell. Humane Claudin-16-Malfunktion ist beschrieben worden mit renalem Verlust von Magnesium und Kalzium (FHHNC, OMIM 248250). Im Wissen dieser humane Erkrankung wurde das Mausmodell als mögliches Studienobjekt für renalen Salzverlust entwickelt. Für nachgelagerten Studien bietet dieses Modell die Option, den Phänotyp unter diätetischer und pharmakologischer Intervention zu evaluieren. Claudin-16-defiziente Mäuse wiesen ein weniger stark ausgeprägtes Krankheitsbild auf als humane FHHNC-Patienten. Dies führte zu der Hypothese, dass die betroffenen Mäuse den renalen Salzverlust teilweise kompensieren können. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand daher in molekularen Analysen renaler Transportmechanismen, um mögliche regulatorische Mechanismen unter gestörter Salzhomöostase zu evaluieren.

Juvenile Claudin-16-defiziente Mäuse wiesen in Analogie zum Erscheinungsbild humaner FHHNC-Patienten eine verstärkte Kalziumausscheidung und einen niedrigen Serum-Magnesiumspiegel auf. Um einen Einblick in die Progression des Krankheitsbildes zu erhalten, wurden zusätzlich zu juvenilen auch neonatale Mäuse am Lebenstag 4 (P4) untersucht. FHHNC-Patienten werden oft in den ersten Lebensjahren klinisch auffällig, die Untersuchung früher postnataler Entwicklungsstadien könnte Hinweise über den natürlichen Verlauf liefern.

Die Serumspiegel von Magnesium waren beim vier Tage alten *Cldn16*-Knockout-Tier im Normbereich. Eine signifikant erhöhte Konzentration von Kalzium in Urinproben konnte bei Claudin-16-defizienten Neonaten allerdings bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium festgestellt werden. Diese Befunde sprechen für eine früh postnatal beginnende Imbalanz der Ionenhomöostase durch die Claudin-16-Defizienz, die vorerst noch Magnesiumverluste intern auszugleichen vermag, möglicherweise durch Mobilisierung aus Speichern wie dem Knochen. Bei diesen Daten ist jedoch zu beachten, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der zugeführten Nährstoffe (Muttermilch versus Standard-Mausfutter), als auch die Art der Sammlung von Urinproben (Spontanurin bei Neonaten versus Sammelurin bei Juvenilen) keinen direkten Vergleich der erhaltenen Daten zulässt.

Eine fortschreitende Kalzifizierung der Niere (Nephrokalzinose), wie bei humanen Patienten mit Claudin-16-Defizienz oft in der zweiten Lebensdekade beobachtet, konnte in diesem Tiermodell in histologischen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür liefern die Befunde des erniedrigten Urin-pH-Wertes in *Cldn16*-Knockout-Mäusen: Renale Kalzifizierungsprozesse werden maßgeblich über den pH-Wert des Harns beeinflusst, eine Ansäuerung wirkt der Bildung von Kalziumphosphatkristallen entgegen, ein alkalisches Milieu hingegen fördert sie [Sayer et al., 2004]. An TRPV5-Knockout-Mäusen, welche mit einer Hyperkalziurie und einem erniedrigten pH-Wert ähnliche Urinwerte wie unser beschriebenes Claudin-16-Defizienzmodell aufweisen, wurde dieser Zusammenhang kürzlich *in vivo* dargelegt: Durch Einkreuzen eines Mausstammes mit Defekt in der renalen Azidifizierung (durch *Atp6v1b1*-Knockout ist eine Untereinheit der H⁺-ATPase des Sammelrohrs infunktionsell) konnte gezeigt werden, dass sich durch die Kombination aus Hyperkalziurie und fehlender Urinansäuerung tubuläre Kalziumphosphatkristalle ausbildeten; die Tiere zeigten zusätzlich eine Wachstumsretardierung und eine stark erhöhte Mortalität in den ersten Lebenswochen [Renkema et al., 2009].

Überträgt man diese Befunde auf unser Tiermodell der Claudin-16-Defizienz, ist zu vermuten, dass der kompensatorische Mechanismus der Azidifizierung die Ausbildung einer Nephrokalzinose verhindert. Ein experimenteller Ansatz zur Inhibition der H⁺-

ATPase könnte diese Kalzifizierungsprozesse im *Cldn16*-Tiermodell möglicherweise auslösen. Umgekehrt bedeutet dies, dass die Stimulation zur Urinansäuerung einen Ansatzpunkt für die klinische Behandlung von FHHNC-Betroffenen bilden könnte, sofern der Krankheitsverlauf milde bzw. in den Anfängen ist.

Auf hormoneller Ebene konnte nachgewiesen werden, dass im Claudin-16-Tiermodell mit Calcitriol und Parathormon (PTH) zwei Regulatoren der Kalzium- und Magnesium-Homöostase induziert worden sind. Beide Hormone wirken auf unterschiedliche Organsysteme, um einem Mangel an bivalenten Kationen entgegenzuwirken (Abb. 40).

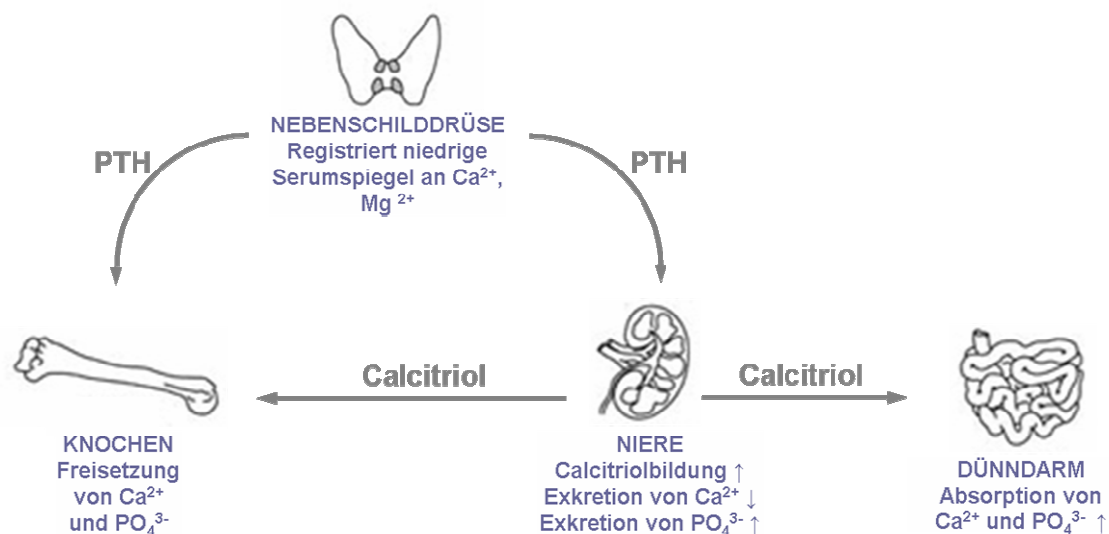


Abb. 40: Hormonelle Regulation der Homöostase an bivalenten Kationen.

Abgebildet sind Wirkungsweisen des Parathormon (PTH) und des Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{Vit D}_3$) in der Homöostase an Kalzium und Magnesium. Modifiziert entnommen dem Linus Pauling Institute, Oregon State University.

Ein Zielort des PTH ist die Niere, wo zum einen im proximalen Nephron die Synthese von Calcitriol stimuliert wird [Jones et al., 1998], zum anderen im distalen Tubulus der Kalziumkanal *Trpv5* aktiviert wird [van Abel et al., 2005]. Eine Induktion beider Mechanismen konnte im Rahmen der Hormon- und Expressionsanalysen bestätigt werden. Weitere Wirkungsweisen des PTH sind die Freisetzung von Kalziumphosphat aus dem Knochen, sowie die Stimulation zur renalen Exkretion von Phosphat. Dies impliziert, dass in unserem Mausmodell neben der Kalzium-Homöostase auch der Phosphat-haushalt betroffen sein könnte. Serumphosphatspiegel unterliegen generell je nach Tageszeit starken Schwankungen [Portale et al., 1987]; so dass der Referenzbereich weit gefasst ist. Unsere Analysegruppen weisen folglich hinsichtlich ihrer Phosphat-spiegel in Serum und Urin eine hohe Spannbreite auf, jedoch ohne dass *Cldn16*^{-/-}-Tiere eine signifikante Änderung oder Tendenz in ihrem Phosphatstoffwechsel zeigen (Daten siehe 7.4). Langfristig könnte die erhöhte Freisetzung von Kalziumphosphat einen Effekt auf das Knochengewebe haben. Calcitriol bewirkt eine verstärkte intestinale Auf-

nahme von Kalzium, sowie ebenfalls eine Mobilisierung des ossär gebundenen Kalziumphosphats [Norman et al., 1993]. Untersuchungsansätze wie etwa Analysen von Knochendichte und Kalziumgehalt des Knochengewebes, wie auch Studien zur Darmresorption waren jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr als Teil dieser Arbeit geplant.

Bemerkenswerterweise weisen *Cldn16*^{+/-} Wurfgeschwister bei Kalziumausscheidung, PTH- und insbesondere Calcitriolanalysen die Tendenz auf, einen intermediären Phänotyp zwischen Knockout- und Wildtyptieren zu zeigen. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Spekulation, dass bereits bei einer defekten Kopie des *Cldn16* minimale Änderungen im Salzmetabolismus vorliegen, welche auf hormoneller Ebene kompensiert werden können. Für diese Theorie würde der Befund einer erhöhten Inzidenz an renalen Auffälligkeiten, insbesondere die Ausbildung von Nierensteinen, in Familienangehörigen von FHHNC-Patienten sprechen [Schneider, 2009].

Parallel zu unseren Arbeiten wurde mit der Veröffentlichung eines transgen-gesteuerten Knockdowns (KD) von Claudin-16 in der Maus ein sehr ähnliches Tiermodell vorgestellt [Hou et al., 2007]. Analog zum Knockout des *Cldn16* weisen *Cldn16*-Knockdown-Mäuse eine Hypomagnesiämie, eine Hyperkalziurie sowie erhöhte Serumspiegel von Calcitriol auf. Diverse Parameter unterscheiden sich jedoch in beiden Tiermodellen: Im *Cldn16*-Knockdown wurden Auffälligkeiten in der Kaliumhomöostase (Hypokaliämie) vorgefunden, wogegen *Cldn16*-Knockout-Mäuse diesbezüglich ohne auffälligen Befund waren. Die Spiegel an PTH waren im Knockdown-Tier unverändert, dafür zeigten sich leichte Anzeichen tubulärer Verkalkungen. Diese Befunde sprechen dafür, dass andere kompensatorische Mechanismen zum Ausgleich der Mineralstoffimbalance im Knockout-Tier zum Tragen kommen als im Knockdown-Modell. Die Ursache könnte in dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der beiden vorliegenden Tierstämme (B6D2F1-Hybridstamm im *Cldn16*-Knockdown versus Sv129 Bl/6 im *Cldn16*-Knockout) liegen, einem bereits beschriebenen Phänomen mit Auswirkung auf den Phänotyp [Hartner et al., 2003]. Eine andere Erklärung könnte in der Methodik an sich liegen: Obwohl auf Proteinebene nicht sichtbar visualisierbar, kann der Knockdown des Claudin-16 möglicherweise nicht vollständig erfolgen und ein Restanteil des Proteins exprimiert vorliegen. Alternativ könnte die als Transgen eingebrachte interferierende RNA in der Zelle akkumulieren und somit andere Stoffwechselprozesse beeinflussen, oder auch das Transkriptionsprofil der Zelle modifizieren. Aus molekulargenetischer Sicht ist das Knockdown-Tiermodell somit kein optimales Abbild der humanen FHHNC.

In einem weiteren Punkt, der Ionenselektivität im TAL, unterscheiden sich beide murinen Claudin-16-Defizienzmodelle: Bei *ex-vivo*-Perfusionsstudien an *Cldn16*-

Knockdown-Mäusen wurde Claudin-16 als nichtselektive Kationenpore identifiziert; durch den Knockdown des Gens wurden Kationenfluxe unterbunden. Im *Cldn16*-Knockout-Tier dagegen wurden Magnesium- und Kalzium-Fluxe spezifisch unterbunden. Dies wirft die Frage nach den genauen pathologischen Veränderungen der Ionenresorption im TAL auf:

Claudin-16-Defizienz könnte eine Inhibition des Natrium-Transports und damit Verlust der Triebkraft für die passive Resorption zweiwertiger Kationen bewirken (postuliert von Hou *et al.*, 2005, siehe auch 1.7). Einer anderen Theorie folgend, bedingt die Abwesenheit von Claudin-16 eine spezifische Blockade des parazellulären Transports von Kalzium und Magnesium (postuliert von Kausalya *et al.*, 2006)

Außer Acht gelassen wird bei diesen Überlegungen jedoch die Rolle des transzellulären Transportweges, welcher möglicherweise in Feedback-Mechanismen mit dem parazellulären Transportweg verknüpft ist. Bei der *ex-vivo*-Technologie stehen die perfundierten Tubulussegmente unter strikter Blockade von membranständigen Ionen transportern und es werden ausschließlich parazelluläre Fluxe gemessen. Das Modell ist somit in Teilen artifiziell und daher nicht abschließend geeignet, eine eindeutige Erklärung für die unterschiedlichen Befunde in beiden Tiermodellen zu liefern. Mausstammspezifische Besonderheiten wie eine leicht abweichende Besetzung oder Aktivierung verschiedener Transportsysteme und -wege im TAL sind dabei durchaus denkbar.

Renale Transkriptomanalysen sollten Aufschluss über molekulare Mechanismen geben, die bei Claudin-16-Defizienz die gestörte Salzhomöostase kompensieren. Für die Familie der Claudine wurden bisher posttranslationale Regulationsmechanismen beschrieben (siehe 1.4), so dass erwartungsgemäß keiner der übrigen Claudin-Subtypen eine signifikant differenzielle Expression aufwies. Da im Claudin-16-defizienten Tier primär die Magnesium- und Kalzium-Homöostase betroffen ist, wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Analyse von Transportern und Regulatoren der bivalenten Kationen gesetzt. Bestätigende Analysen auf Proteinebene konnten allerdings aus Gründen des Umfangs nicht mehr als Teil dieser Arbeit durchgeführt werden.

Als differenziell reguliert befundene Gene mit Funktion in der renalen Kalzium-Homöostase beinhalteten überwiegend Transportproteine in Zellen des distalen Tubulus. Die drei Transportkomponenten TRPV5 (apikaler Kanal), Calbindin-D9k (intrazellulärer Transporter) und Ncx1 (basolateraler Antiporter) zeigen einen alternativen Resorptionsweg des Kalziums auf. Durch die im Tiermodell beschriebene Störung der parazellulären Resorption wird somit ein nachgelagerter Transportmechanismus im distalen Nephron aktiviert, um den renalen Kalziumverlust auszugleichen. TRPV6 weist eine hohe Homologie zum Familienmitglied TRPV5 auf, und wurde ebenfalls als apika-

ler Kalziumkanal beschrieben, mit einer spezifischen Expression u.a. im distalen Nephron der Maus [Nijenhuis et al., 2003]. Seine Regulierbarkeit durch Calcitriol zeigt in unserem Tiermodell einen weiteren hormonellen Wirkmechanismus auf. Ein weiterer Kandidat im distalen Nephron, die ATP-getriebene basolaterale Kalziumpumpe *Pmca1*, war auf Transkriptionsebene nicht signifikant hochreguliert.

TRMP6, der *gatekeeper* der Magnesiumresorption im distalen Nephron [Alexander et al., 2008 ; Walder et al., 2002], konnte als transkriptionell hochreguliert identifiziert werden und weist somit auf eine kompensatorische transzelluläre Magnesiumresorption im Nierentubulus hin. Zwei putative Proteine, welche im renalen Magnesiumstoffwechsel von Bedeutung sein könnten, wurden mittels Microarray-Analysen identifiziert: *Atp13A4* und *Cyclin M2*. *Atp13A4* zählt zu den P_5 -ATPasen, für welche eine Funktionalität als Ionenpumpen spekuliert wird [Kwasnicka-Crawford et al., 2005]. Eine schlussfolgernde Theorie wäre, dass *Atp13A4* somit eine Rolle in der bis dato ungeklärten basolateralen Extrusion des Magnesiums in Zellen des distalen Tubulus spielen könnte. *Cyclin M2* gehört zur Familie der ACDP-Transmembranproteine und wurde in bisherigen funktionellen Studien als Transporter charakterisiert, welcher eine hohe Spezifität für Magnesium aufweist und somit in physiologischen Systemen vermutlich in der Magnesium-Homöostase eine wichtige Aufgabe erfüllt. Die genaue Wirkungsweise wurde bisher jedoch noch nicht aufgeklärt [Goytain und Quamme, 2005]. Denkbar ist eine Funktion als Transportprotein selbst, oder auch als Stabilisator oder Regulator in Magnesiumtransportprozessen. Im nachfolgenden Kapitel wird der Fund dieser putativen Magnesiumtransporter im Rahmen eines Forschungsausblicks eingehender diskutiert. Nachfolgend abgebildetes Übersichtsschema greift die Befunde der gestörten Homöostase an bivalenten Kationen auf (Abb. 41)

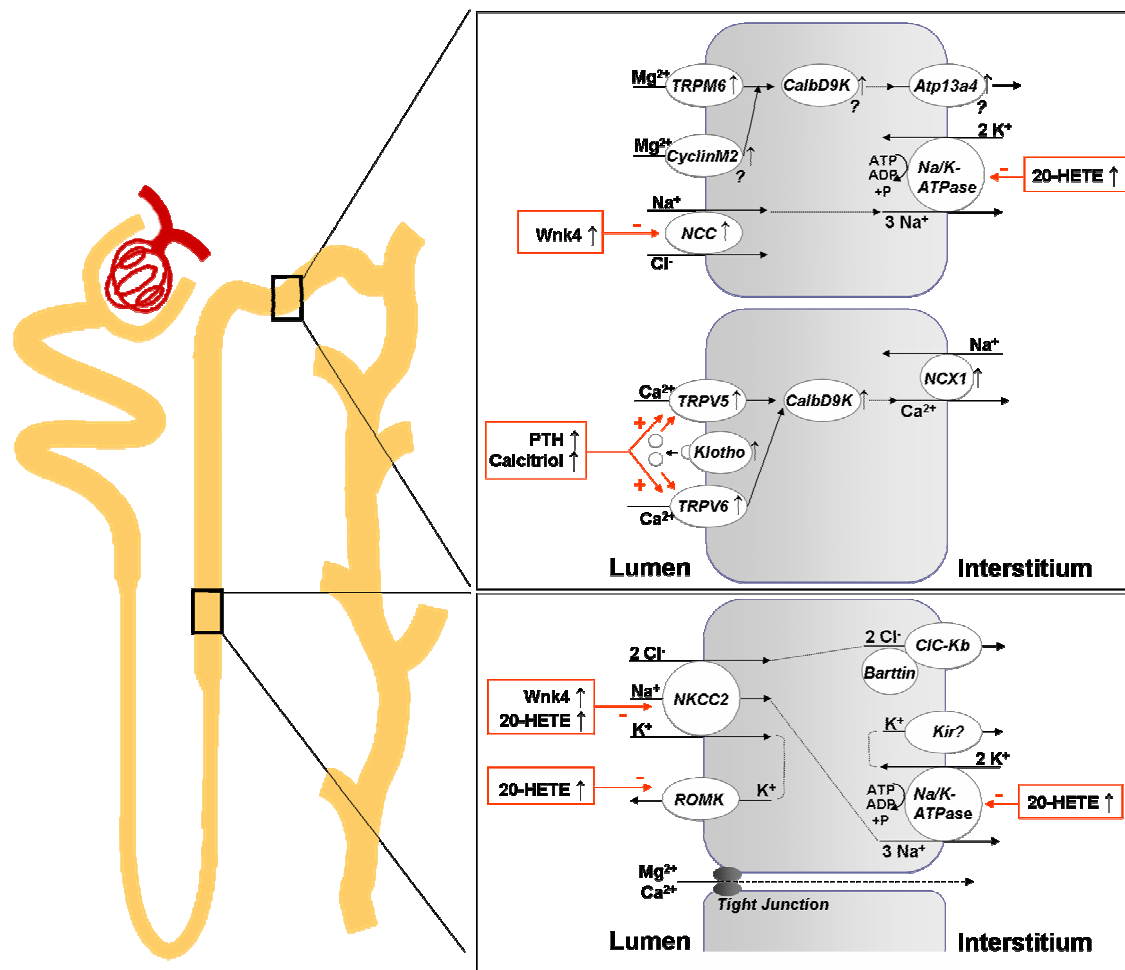


Abb. 41: Regulatorische Mechanismen im Nephron unter Claudin-16-Defizienz.

Dargestellt sind ausgewählte Ionen-transportvorgänge (schwarz) sowie Angriffspunkte von positiven (+) und negativen (-) Regulatoren im TAL bzw. DCT des Nephrons (rot). Senkrechte Pfeile (↑) weisen auf regulierte Transkripte hin. Fragezeichen markieren hypothetische Transportwege. Stöchiometrische Verhältnisse werden nicht exakt wiedergegeben.

Der Wnk-Spak/OSR1-Signalweg wurde als wichtiger Regulator des renalen Salzmetabolismus und der Blutdruckkontrolle beschrieben; Zielkomponenten sind u.a. die Natriumtransporter NCC und NKCC2, deren Aktivität über Phosphorylierung reguliert wird [Richardson und Alessi, 2008]. Für Wnk4 als Komponente des Signalweges, sowie für NCC konnte mittels Transkriptomanalysen eine differenzielle Regulation bestätigt werden. Mit Wnk1 und Spak konnten weitere Kandidaten dieses Signalweges durch Microarray-Analysen ausfindig gemacht werden; deren Induktion konnte jedoch mittels RealTime PCR nicht abschließend bestätigt werden. Weitere Natriumtransporter des Tubulussystems bzw. des Sammelrohres zeigten in den Transkriptionsanalysen keine Auffälligkeiten. Eine differenzielle Regulation auf posttranslationaler Ebene ist jedoch für NHE3, NKCC2, ENaC und auch NCC beschrieben [Gimenez und Forbush, 2003 ; Hamm et al., 2010 ; Knepper und Brooks, 2001] und demzufolge nicht auszuschließen.

Die Befunde lassen Schlüsse auf eine unter Claudin-16-Defizienz modulierte Natrium-Homöostase zu. Die Expressionsprodukte der identifizierten Transkripte *Comt1* (codierend für Catechol-o-Methyltransferase) und *Cyp4a12* (codierend für 20-HETE Synthase) sind im Zusammenhang mit Hypertonie beschrieben worden. Man könnte demzufolge einen weiteren Kompensationsmechanismus spekulieren: Die Einstellung des Blutdrucks infolge tubulärer Imbalanz der Salzhomöostase.

5.2.1 *Cldn16*: Zusammenfassung und Forschungsausblick

Der Knockout von *Cldn16* in der Maus wurde erfolgreich realisiert. Zum einen weist dieses Tiermodell viele Gemeinsamkeiten mit der menschlichen Erkrankung FHHNC auf und wird in nachfolgenden Studien unter Salzstress und pharmakologischer Intervention fortführend evaluiert werden. Zum anderen konnten Transkriptomanalysen an diesem Mausdefizienzmodell zu einem besseren Verständnis von tubulären Salzresorptionsprozessen beitragen.

Die renalen Transkriptomanalysen konnten außerdem zwei induzierte Gene mit postulierter Funktion im Magnesiumstoffwechsel identifizieren, welche nachfolgend abgehandelt werden sollen:

(i) Das Gen *Atp13A4* codiert für ein putativ mehrspänniges Transmembranprotein, welches in die Familie der kationenspezifischen P5 ATPasen eingruppiert wird. mRNA-Analysen konnten die Expression in unterschiedlichen Geweben, u.a. verschiedenen Gehirnarealen nachweisen [Kwasnicka-Crawford et al., 2005]. Diese Proteinfamilie ist bisher ansatzweise erforscht, aber biochemisch noch nicht ausreichend charakterisiert. Funktionell ist das Protein im Zusammenhang mit neurologischen Defekten beschrieben worden [Kwasnicka-Crawford et al., 2005 ; Vallipuram et al., 2009]. In der hochkonservierte Genfamilie der P5 ATPasen wurde ein Mitglied als kalziumspezifisch beschrieben [Cronin et al., 2002]. Da Kalzium in diversen neurologischen Prozessen wie der Signalübertragung eine Rolle spielt, würde dies die Theorie einer neuronalen Funktion stützen. Hinsichtlich einer renalen Funktion sind jedoch bisher keine Daten veröffentlicht oder Theorien bekannt.

(ii) *Cnnm2* codiert für das Protein Cyclin M2 (synonym: ACDP2, *ancient conserved domain protein*), ein Protein der ACDP-Familie. Es wird eine Topologie als mehrspänniges Transmembranprotein postuliert. Elektrophysiologische Untersuchungen konnten Cyclin M2 eine spannungsabhängige Spezifität für eine Reihe an bivalenten Kationen wie Magnesium zuordnen, jedoch nicht für Kalzium und einwertige Ionen [Goytain und Quamme, 2005]. Das Protein Cyclin M2 ist in diversen Geweben vorzufinden, eine tragende Funktionalität scheint ihm in der Niere zuzukommen, einem Organ mit Schlüsselfunktion in der Regulation der Magnesium-Homöostase. In Fütterungsexpe-

perimenten an Mäusen weist *Cnnm2* unter Niedrigmagnesium-Konditionen eine erhöhte Expression auf [Goytain und Quamme, 2005]. Dieser Befund ist insofern interessant, da sich die Aussage mit unseren *in vivo*-Daten des *Cldn16*-Mausmodells deckt: Unter Magnesiummangel ist *Cnnm2* kompensatorisch hochreguliert.

Datenbankanalysen weisen dem Gen unterschiedliche Spleißvarianten zu: Neben der gesamt exprimierten Form (*Cnnm2*) wurden Transkripte nachgewiesen, denen Exon 6 fehlt (*Cnnm2*ΔExon6). Eine unterschiedliche Funktionalität beider Varianten ist bisher nicht beschrieben worden. Mittels mRNA-Expressionsanalysen auf cDNA-Gewebepräparationen (Mouse MTC Panel I, III, Clontech) konnte gezeigt werden, dass beide Varianten in nahezu allen Geweben vorzufinden sind (Abb. 42). Einzelne Organe zeigen jedoch eine Präferenz für eine der beiden Varianten auf: So ist in Skelettmuskel und Gehirn nahezu ausschließlich ungespleißtes *Cnnm2* nachzuweisen, in der Milz dominiert die Variante, der Exon 6 fehlt.

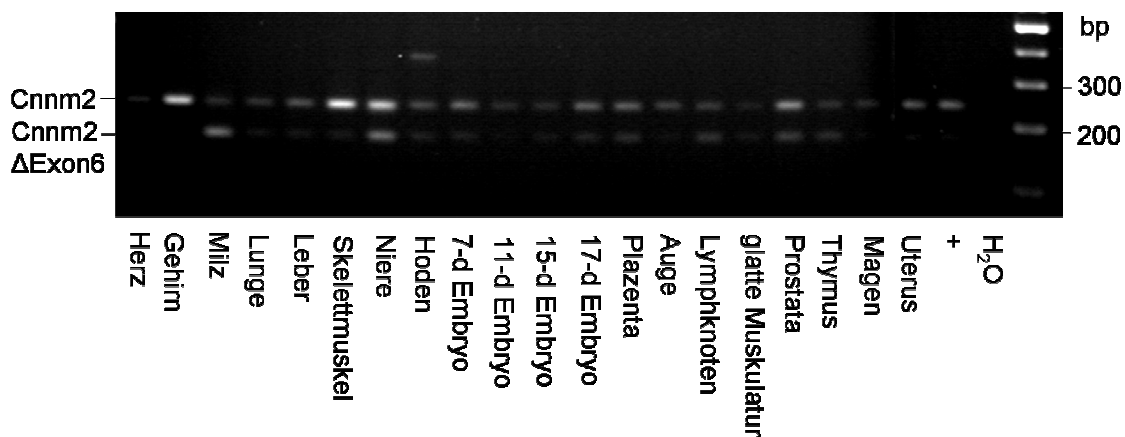


Abb. 42: *Cnnm2*-Expression in unterschiedlichen Geweben.

Dargestellt ist die Expression beider *Cnnm2*-Varianten als semiquantitative PCR auf cDNA-Proben eines Gewebe-Panels. Positivkontrolle: Panel-interne Gewebepräparation (+).

Funktionelle Analysen von Atp13a4 und Cyclin M2 stehen derzeit in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern an. Tubulussegmentspezifische Analysen auf mRNA-Ebene sollen die renale Expression näher beleuchten. Transfektionsstudien werden sowohl die zelluläre Lokalisation als auch die Funktionalität hinsichtlich der Modulation von Ionenströmen evaluieren. Aus den erhaltenen Daten erhoffen wir uns ein detailliertes Verständnis von der Wirkungsweise beider Proteine in der renalen Ionenhomöostase.

5.3 *Cldn10* – Phänotyp und Ansätze zur Aufklärung

Die physiologische Funktion des Claudin-10 im Organismus ist noch nicht geklärt, Genmutationen und ein damit einhergehendes Krankheitsbild wurde bis dato nicht beschrieben. Die Isoform b des Claudin-10 ist weit verbreitet exprimiert. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass *Cldn10*-Knockout-Mäuse potentiell eine Fehlfunktion mehrerer Organe und eine eingeschränkte Lebensfähigkeit aufweisen.

Unter Claudin-10-Elimination sterben die betroffenen Mäuse am ersten Lebenstag, die postnatale Überlebenszeitspanne beträgt durchschnittlich etwa 6 – 18 Stunden. Eine klassische Aufarbeitung des renalen Phänotyps, in Analogie zu Untersuchungen im *Cldn16*^{-/-}-Tier, war somit nicht durchführbar. Die genaue Todesursache konnte in unseren Analysen bisher nicht identifiziert werden: Claudin-10-defiziente Tiere zeigten hinsichtlich Größe, Gewicht, Hautfärbung, Anatomie und Organentwicklung keine Auffälligkeiten. Mit dem Wissen, dass Claudin-10 in den Tight Junctions eine Funktion erfüllt, ist zu vermuten, dass im Knockout-Tier eine gestörte Epithelintegrität zu einer Dysfunktion in einem oder mehreren Organen führt. Die genauen pathologischen Mechanismen sind jedoch nur dann augenscheinlich, wenn zugleich morphologische Veränderungen auftreten, etwa in Form von deutlichen Wassereinlagerungen in Geweben. Dies war in diesem Tiermodell nicht der Fall.

Zwei Anhaltspunkten für die Letalität wurde nachgegangen: (i) Zum einen zeigt das Expressionsmuster des Claudin-10 eine unterschiedlich starke Verteilung in den einzelnen Organen. In Geweben mit hoher Expression kann von einer gestörten epithelialen Funktion ausgegangen werden. Besonders stark vertreten ist Claudin-10 in Lunge, Niere und Pankreas, eine mittelhohe Expression lässt sich etwa im Gehirn nachweisen, und so gut wie keine im Herzen (siehe auch Abb. 7, 8). (ii) Zum anderen kann der Eintritt des Todeszeitpunkts Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Defekt zulassen, in Abhängigkeit davon, welche postnatalen Reifungs- und Anpassungsprozesse der Organismus durchläuft. Turgeon und Meloche haben kürzlich einen umfangreichen Überblick über neonatal letale Mausdefizienzmodelle zusammengestellt [Turgeon und Meloche, 2009] (Abb. 43).

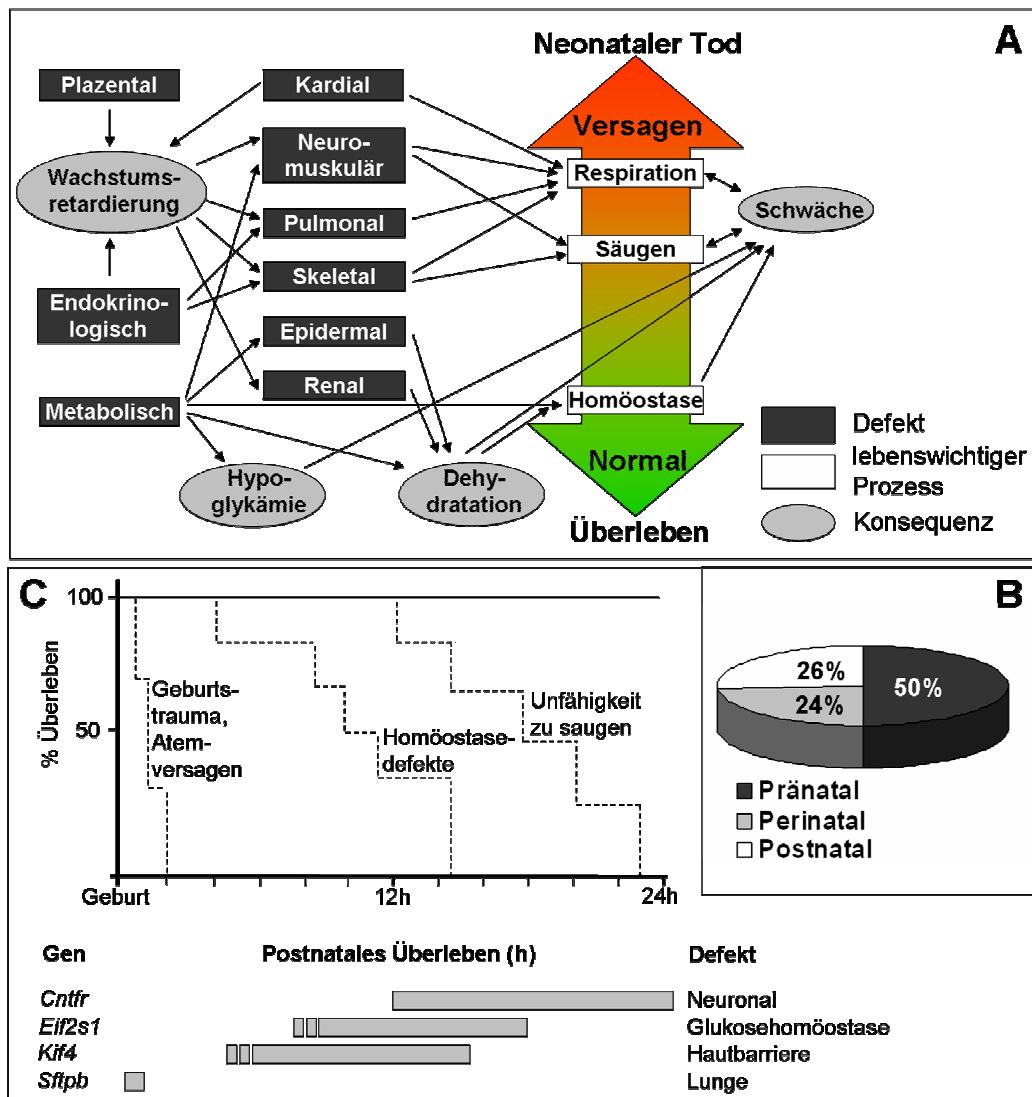


Abb. 43: Neonatal letale Mausmodelle.

Die biologische Vernetzung und Kausalität zwischen Organdefekt und physiologischen Prozessen ist in (A) dargestellt und verdeutlicht die Komplexität der neonatalen Adaptation. Der Todeszeitpunkt in neonatal letalen Mausmutanten kann prä-, peri- und postnatal auftreten (B). Die Überlebensspanne variiert in Abhängigkeit des Defektes, der im Mausmodell hervorgerufen wird (C): Dargestellt sind die Überlebenskurven von Mausmutanten mit physiologischem Defekt (C, oben), sowie der Todeszeitraum in einzelnen gendefizienten Mausmodellen (C, unten). Graue Balken symbolisieren die postnatale Zeitspanne, in welcher der Tod eintritt. *Cntfr* – Ciliary neurotrophic factor receptor, *Eif2* – Eucaryotic translation initiation factor 2, *Kif4* – Kinesin family member 4, *Sftpb* – Surfactant protein b. Entnommen und modifiziert nach Turgeon und Meloche, 2009.

Aus dem Übersichtsschema (Abb. 43 A) wird verdeutlicht, wie komplex die physiologischen Prozesse zusammenwirken und sich auf das postnatale Überleben auswirken. Zudem sind die engen Zeitfenster ersichtlich (Abb. 43 C), welche je nach Fehlfunktion nur einen distinkten postnatalen Zeitraum einnehmen und daher durchaus grobe Abschätzungen der Ursache von Organdefekten zulassen.

Renale Analysen

Homöostasedefekte wurden als eine mögliche Todesursache in Betracht gezogen. Die Niere hat eine wichtige Aufgabe in der Elektrolythomöostase. Mit dem Hintergrundwissen, dass die Tight Junctions an epithelialen Ionentransportprozessen beteiligt sind, und aufgrund der hohen *Cldn10*-Expressionsraten entlang des Tubulus, wurden zunächst funktionelle renale Parameter in Form von Serum- und Urinalysen angestrebt. Die erhaltenen Elektrolytwerte zeigten größtenteils keine Änderungen oder Tendenzen hinsichtlich einer Elektrolytimbalanz. Die Magnesiumkonzentration im Urin war im Knockout-Tier jedoch signifikant reduziert. Mit diesem Befund ergab sich ein Anhaltspunkt auf eine gestörte Ionenhomöostase unter Claudin-10-Verlust. Welche funktionelle Störung dies bewirkt, konnte nicht abschließend festgestellt werden. Folgende Ursachen könnten dem Phänomen zugrunde liegen:

(i) Denkbar wäre ein renaler Resorptionsdefekt, der zu einer Hypomagnesiurie führt. Die gemessenen Serumwerte an Magnesium liegen jedoch in einem physiologisch unauffälligen Bereich. Zur Aufklärung wäre die Ermittlung der fraktionellen Exkretion über die Bestimmung der Magnesium- und Kreatininwerte in Urin und Serum nötig. Aufgrund von technischen Limitierungen bei der Vermessung von Serumproben mit geringem Volumen, und aufgrund der maternellen Supplementation der Neonaten mit Proteinen wie Kreatinin, welches die Messungen verfälschen würde, kann diese Fragestellung nicht abschließend geklärt werden.

(ii) Eine weitere Ursache einer Hypomagnesiurie könnte in einer Malabsorption von Mineralien und somit einer Störung des Elektrolythaushaltes liegen. Für ein Nachgehen dieser Hypothese wären fortführende Analysen hilfreich, etwa eine histologische Aufarbeitung des Darms, eine kontinuierliche Überwachung der Neonaten ab dem Zeitpunkt der Geburt zum Verfolgen der Nahrungsaufnahme, oder Untersuchungen von funktionellen Regulatoren der Ionenhomöostase, wie z.B. Parathormon. Zudem müsste geklärt werden, aus welchem Grund andere Ionenspezies nicht betroffen zu sein scheinen, bzw. inwiefern deren Homöostase aus internen Speichern abgepuffert werden kann. Diese Theorie konnte bisher aufgrund von technischen Schwierigkeiten nicht weiter verfolgt werden.

(iii) Zudem könnte eine Störung der intrazellulären Speicherung des Magnesiums eine Erklärung des Phänotyps liefern. Den bedeutendsten Magnesiumspeicher stellt das Skelett dar, wo Magnesium überwiegend in gebundener Form als Magnesiumapathit vorliegt, gefolgt von Muskelgewebe [Elin, 1994]. Magnesium ist an einer Vielzahl metabolischer Prozesse beteiligt. Durch seine direkte Rolle in ATP-gekoppelten Reaktionen stellt Magnesium eine wichtige Größe im Energiestoffwechsel der Zelle dar [Laires et al., 2004]. Inwiefern die Tight Junction als parazelluläre Struktureinheit durch Claudin-

10-Verlust einen direkten Einfluss auf die Freisetzung und Bioverfügbarkeit des Magnesiums haben könnte, kann an dieser Stelle nicht abschließend erklärt werden.

Pulmonale Analysen

Claudin-10-defiziente Tiere sind in der Lage zu atmen und weisen auch keine Hautverfärbungen als Anzeichen einer Zyanose auf. Dennoch wurde die Lunge als mögliches primär von Claudin-10-Verlust betroffenes Organ näher untersucht. Neonatales murines Lungengewebe unterliegt diversen Reifungs- und Differenzierungsprozessen, die Entwicklung der Alveolen aus ihrem Vorläuferstadien, den primären Sacculi, findet erst postnatal statt [Amy et al., 1977]. Studien konnten zeigen, dass ein Zelltyp des bronchiolären Epitheliums, so genannte Clarazellen, zum Zeitpunkt der neonatalen Reifung und Entwicklung eine sehr hohe Expression von Claudin-10 aufweist [Zemke et al., 2009]. Clarazellen sezernieren CCSP (*Clara Cell Secretory Protein*), und sind außerdem an der Produktion einzelner Surfactant-Komponenten beteiligt [Demello et al., 2002 ; Harvilchuck et al., 2008 ; Miller und Marty, 2010]. Den Hauptteil der Sekretion an Surfactant übernehmen jedoch Alveolarzellen des Typs II [Whitsett et al., 2010].

CCSP sowie Surfactant erfüllen eine wichtige Aufgabe in der Lungenfunktion: Die Surfactant-Proteine B und C sind an der Auskleidung der Alveolen beteiligt. Die Wirkungsweise dieser Komponenten besteht in der biophysikalischen Herabsetzung der Oberflächenspannung. Auf diese Weise trägt diese oberflächenaktive Substanzklasse zum Gasaustausch zwischen Alveolen und Blutgefäßen bei [Orgeig, 2007]. CCSP sowie die Surfactant-Proteine A und D erfüllen eine wichtige Aufgabe als Immunomodulatoren in der Lunge [Pastva et al., 2007 ; Reynolds et al., 2007]. CCSP wurde zudem als wichtiger Marker der neonatalen Entwicklung des Bronchiolarepithels beschrieben [Hackett et al., 1992].

Unter Claudin-10-Defizienz wurde spekulativ eine gestörte Lungenepithelintegrität angenommen. Folgende Szenarien könnten damit einhergehen: (i) Eine unzureichende Freisetzung der Komponenten CCSP und Surfactant und damit verbunden eine Störung des pulmonalen Gasaustausches oder der Immunabwehr, (ii) eine Einschränkung des postnatalen *Clearings* der Lunge von Fruchtwasser oder (iii) eine Infiltration von Flüssigkeit und die Ausbildung eines Ödems. Der Effekt des Proteinverlustes wäre somit keine akute Blockade der Atmung in den ersten Lebensminuten, sondern ein einschleichender Prozess im Rahmen der postnatalen Lungenreifung, einhergehend mit einer mehrstündigen Überlebensfähigkeit.

Erste Analysen deuten darauf hin, dass Transkripte der Surfactant-Proteine im Claudin-10-defizienten Tier differenziell reguliert sind. Untersuchungen der funktionellen Lungenparameter ergaben keine eindeutigen Hinweise auf eine Lungenfunktionsstö-

rung. Im *Cldn10*-Knockout-Tier konnte weder ein gestörter Lungen-Wasserhaushalt, noch eine signifikant veränderte Atmung beobachtet werden. Auch bei diesen Untersuchungen kam erschwerend hinzu, dass die neonatale Entwicklungsphase nicht distinkt bestimmt werden konnte und Würfe mit unterschiedlicher Lebensstundenzahl in die Analysen mit eingingen. Histologische Untersuchungen von Lungengewebe sollten den Datensatz ergänzen. Anhand von Übersichtsfärbungen sollte die Lungenmorphologie hinsichtlich der Sacculi-Räume und der Integrität des bronchiolären Epithels untersucht werden. Zudem können Infiltrationen von Immunzellen auf das Vorliegen einer Entzündungsreaktion hindeuten. Hier konnte jedoch in den Präparaten kein Unterschied zwischen Claudin-10-defizienten Mäusen und Kontrolltieren festgestellt werden. Hochauflösendere bildgebende Verfahren können unter Umständen morphologische Auffälligkeiten der Epithelbeschaffenheit aufdecken und werden möglicherweise Gegenstand zukünftiger Analysen von Kooperationspartnern sein.

Nieren- und Lungenfunktion Claudin-10-defizienter Tiere wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Es ist jedoch auch denkbar, dass andere Organe unter Claudin-10-Defizienz eine Fehlfunktion aufweisen. So könnte eine eingeschränkte Herzfunktion im Knockout-Tier vorliegen, oder die Integrität des Endothels von Blutgefäßen gestört sein. Das Gehirn kontrolliert wichtige Funktionen, u.a. die Motorik, den Stoffwechsel, die Atmung sowie den Blutkreislauf. Eine Fehlfunktion einzelner Gehirnbereiche könnte sich somit auf diese überlebenswichtigen Funktionen auswirken. Aufgrund der Komplexität entsprechender Analyseverfahren wurden dahingehende Untersuchungen nicht mehr als Teil dieser Arbeit geplant.

5.3.1 *Cldn10*: Zusammenfassung und Forschungsausblick

Die Erstellung und Grundcharakterisierung des Claudin-10-defizienten Mausmodells konnte erfolgreich realisiert werden. *Cldn10*^{-/-}-Mäuse erwiesen sich als postnatal letal. Die erhaltenen Daten deuten auf einen komplexen Phänotyp hinsichtlich eines gestörten Magnesiumstoffwechsels hin, dessen Ursachen weiter aufzuklären sind. Die Analyse weiterer Organsysteme, wie etwa des Gehirns, sind als zukünftiges Projekt optimiert, aus Gründen des Umfangs jedoch nicht mehr als Teil dieser Arbeit geplant.

Aufgrund der Einschränkungen hinsichtlich der Gewinnung und Präparation von Proben neonataler Mäuse soll der Fokus in fortführenden Studien zusätzlich auf die Analyse der konditionellen *Cldn10*-Knockout-Linie gelegt werden: Durch die Generierung einer gewebespezifischen Knockout-Mauslinie wird die Möglichkeit geschaffen, die Funktion einzelner Organe unter Claudin-10-Verlust zu analysieren; zusätzlich kann

auf diese Weise festgestellt werden, welche Organ- oder Gewebedefekte primär mit der Mortalität bei Claudin-10-Dysfunktion in Verbindung stehen.

Als erste Studienreihe wurden renale und neuronale Defizienzanalysen geplant durch das Einkreuzen einer $T\alpha 1$ -Cre-Linie zum Knockout von *Cldn10* im zentralen Nervensystem [Coppola et al., 2004], sowie einer *Emx1*-Cre-Linie zur spezifischen Rekombination in Gesamtnierengewebe und Prosencephalon [Iwasato et al., 2000]. Mittelfristig ist der Knockout von *Cldn10* in pulmonalem Gewebe unter Einzucht induzierbarer Cre-Linien unter Kontrolle des CCSP bzw. des SP-C-Promotors (CCSP-rtTA- bzw. SP-C-rtTA-Cre) angedacht [Perl et al., 2002]. Eine weitere Strategie, postnatale Defizienzstudien durch das Einkreuzen einer Mauslinie mit induzierbarer ubiquitärer Expression des Cre-Transgens [Hayashi und McMahon, 2002], wird als langfristiges Projekt geplant. Diese Analysen sollen es ermöglichen, die Aufarbeitung des Phänotyps zu komplettieren.

6 Zusammenfassung

Claudin-16 und Claudin-10 sind Tight Junction-Proteine und erfüllen eine wichtige Aufgabe in der Regulation von parazellulären Transportprozessen. Während *Cldn10* in vielen epithelialen Geweben exprimiert wird, zeigt *Cldn16* eine spezifische Expression im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Mutationen im menschlichen *CLDN16*-Gen sind mit dem renalen Verlust von Kalzium und Magnesium beschrieben worden und manifestieren sich in der Erkrankung Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC), welche im Kindes- und Jugendalter mit fortschreitender Niereninsuffizienz einhergeht. Die *in vivo*-Rolle des Claudin-10 ist bislang nicht geklärt, seine Lokalisation entlang des Nephrons und die hohe Expression im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife lässt eine Funktion in der renalen Ionenhomöostase vermuten.

Als Ziel dieser Arbeit wurden konditionelle Maus-Defizienzmodelle für Claudin-16 und Claudin-10 mittels Cre / lox-Technologie erstellt und hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert.

Cldn16-Knockout-Mäuse haben einen renalen Kalzium- und Magnesiumverlust. Eine Nephrokalzinose wurde nicht beobachtet, im Vergleich zur humanen FHHNC ist die Progression des Krankheitsbildes im Mausmodell somit weniger stark ausgeprägt. Hormonelle Mechanismen zur Kompensation des renalen Kalzium- und Magnesiumverlustes konnten identifiziert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass durch Azidifizierung des Urins Kalziumpräzipitationen verhindert werden konnten. Über Microarray-Analysen wurden zusätzlich differenziell regulierte Transkripte relevanter Transporter insbesondere für Kalzium und Magnesium gefunden, welche dem renalen Salzverlust entgegenwirken. Auf diese Weise ließen sich zudem unbekannte bzw. unzureichend beschriebene Proteine identifizieren, denen eine Rolle im renalen Ionentransport zugeordnet werden konnte: Zwei gefundene Transkripte, die mit renalem Magnesiumtransport in Verbindung gebracht wurden, erwiesen sich als interessante Kandidaten für genetisch bedingte Störungen im Magnesium-Stoffwechsel. Diese putativen Magnesium-Transporter werden derzeit funktionell charakterisiert.

Claudin-10-defiziente Tiere weisen einen postnatal letalen Phänotyp ungeklärter Ursache auf. Histologische und funktionale Analysen von Lungen- und Nierengewebe wurden durchgeführt und lieferten keine eindeutige Ursache der Mortalität unter Claudin-10-Defizienz. Jedoch konnten Auffälligkeiten in der Magnesium-Homöostase festgestellt werden, welche einen Anhaltspunkt für gezieltere Nachforschungen der Todesursache bieten.

Die erstellten Mausmodelle leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis des parazellulären Ionentransportes. Sie bieten zudem eine Grundlage für nachfolgende Stu-

dien, etwa zur diätetischen oder pharmakologischen Intervention unter Claudin-16-Defizienz, und zur Generierung von Mauslinien mit gewebespezifischer Defizienz von Claudin-10.

Anhang

Abkürzungen

A	Ampere
ACDP	<i>ancient conserved domain protein</i>
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
C	Coulomb
ca	circa
CaSR	Calcium Sensing Receptor
CCF	central core facility
CCSP	Clara Cell Secretory Protein
CCR	Center for Cardiovascular Research
CD	<i>collecting duct</i> , Sammelrohr
<i>Cldn</i>	Claudin (murines Gen)
<i>CLDN</i>	Claudin (humanes Gen)
CMV	Cytomegalievirus
COMT	Catechol-o-Methyltransferase
cpm	<i>counts per minute</i> , Zählung pro Minute
CRE	<i>cyclization recombination enzyme</i>
CT	<i>connecting tubule</i> , Verbindungsstück
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DCT	<i>distal convoluted tubule</i> , distaler Tubulus
df	<i>degrees of freedom</i> , Freiheitsgrade
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTA	Diphtherietoxin alpha
E	embryonaler / pränataler Entwicklungstag bei murinen Embryonen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
F	Farad
F	Zuchtgeneration
f	femto
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FHHNC	familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
FKS	fetales Kälberserum
fl	<i>floxed</i> , gefloxt
for	<i>forward</i> , vorwärts
FRT	<i>Flp recombination target</i>
g	Gramm
HE	Hämatoxylin / Eosin
HETE	<i>hydroxy eicosatetraenoic acid</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
kb	Kilobasen
KD	Knockdown

KI	Knock-In
KO	Knockout
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
lox	<i>locus of x-ing over</i>
m	milli
M	molar
MDC	Max-Delbrück Centrum
MDCK	<i>Madine Darby Kidney Cell</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular regulated kinase</i>
μ	mikro
n	nano
NEAA	<i>non essential amino acids</i> , nichtessenzielle Aminosäuren
Neo	Neomycin / Neomycinresistenzmarker
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NHE	<i>sodium-hydrogen exchanger</i>
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	Parentale Zuchtgeneration
P	(postnataler) Lebenstag bei neonatalen und juvenilen Mäusen
p.A.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
P/C/I	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDZ	<i>PSD95 / Drosophila septate junction protein disc-large / ZO-1</i> (erstmalige Beschreibung der PDZ-Domäne in besagten 3 Proteinen)
PFA	Paraformaldehyd
PGES	Prostaglandin-E-Synthase
PGE2	Prostaglandin-E 2
PGK	Phosphoglyceratkinase
PKA	Proteinkinase A
Pkt.	Punkt
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran
POD	Peroxidase
PT	proximaler Tubulus
PTH	Parathormon
R	Widerstand
R	Rückkreuzungsgeneration
RDS	respiratorisches Distress-Syndrom
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
ROMK	<i>Renal Outer Medullary Potassium channel</i>
rte	transepithelialer Widerstand
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SP	Surfactant Protein
SPF	<i>specific pathogen free</i> (spezifisch pathogenfrei)
SSC	<i>saline sodium citrate buffer</i>
t	Zeitkonstante
targ	<i>targeted</i> , getargetet
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tAL	<i>thin ascending limb</i> , dünner aufsteigender Ast der Henle-Schleife
TAL	<i>thick ascending limb</i> , dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife
TBE	Tris-Borat-EDTA

tDL	<i>thin descending limb</i> , dünner absteigender Ast der Henle-Schleife
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight Junction
TER	<i>Transepithelial Resistance</i> , transepithelialer Widerstand
TRPM/TRPV	<i>Transient Receptor Potential Melastatin / Vanilloid</i>
U	Spannung
ÜN	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
VT	Volumenteil
Vte	Transepitheliale Spannung
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen / Volumen)
WNK	<i>With-no-Lysine</i> -Kinase
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht / Volumen)
ZO	<i>zonula occludens</i>
' / min	Minuten
'' / s	Sekunden
Ω	Ohm
∞	unendlich
Δ	delta (Differenz)

Abkürzungen für Länder und Staaten entsprechen den internationalen Standards.

Sequenzen und PCR-Programme

Tab. 9: Exzisionssequenzen

loxP	ataacttcgtatagcatatcattatcacgaagttat
FRT	gaagttcctattctctagaaagtataggaacttc

Tab. 10: Primer zur präparativen Amplifikation

Primer Nr.	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
24	gagggtaccatccttacttgggcttgctc	Knockout-Vektor <i>Cldn16</i>
25	taggtaccaggtgccacatacaggag	
26	atgaattcaacagcacatgtgaggaacc	
27	gtctcgagctatggtcccatattcattc	
29	gtgcggcgccagtagcctatggtccc	
58	ttcctcttggtcaaatgg	
59	gaccagttggagtctgta	
60	ataatgtatgctatacgaagttatcagctgatagttcaagtattct	
61	tcgtatagcatatcattatacgaagttatcagggatatttactactg	
31	tcggtacctgcaggctgactggcttgg	Knockout-Vektor <i>Cldn10</i>
32	taggtaccagccctcggtaaattccag	
33	ttgaattcattgatgaggatgctgtc	
47	tctccttctccgccttgatac	
65	cagcgccgcagcctgtttgtcttctccc	
77	agctgtcggtgggtgttg	
78	taacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgttgctggcatgtgaag	
79	ccctcatcaagtgggactctccgtatagcatatcgaagttatgatatc	
80	cctgggctaccagcaagac	
110	attgtagataatggtccagcc	Hybridisierungssonde <i>Cldn16</i>
111	agccaagcaatcccttgag	
131	gtgcgtgttgctgaggttc	Hybridisierungssonde <i>Cldn10</i>
132	gtgaagtcgcaagggaag	

Tab. 11: PCR-Reaktionen zur Genotypisierung

Zielgen Allel	Zusammensetzung und PCR-Programm	Primer (Nr, Konz., 5'- 3' - Orientierung)	Banden (bp)
Cre - Transgen	1x ThermoPol Puffer (NEB), 2 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 20'' 60° C, 30'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	240 (0,2 µM), cgccatccacgctgttttgacc 241 (0,2 µM), cagccccggaccgacgatgaag	420 (cre+)
Flp - Transgen	1x ThermoPol Puffer (NEB), 2 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 20'' 60° C, 30'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	258 (0,2 µM), cactgatattgtaagtagttgc 259 (0,2 µM), ctagtgcgaagtagtgatcagg	680 (flp+)
Sry-Allel (Y-Chrom.) Geschlechtsbestimmung	1x ThermoPol Puffer (NEB), 0,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM dNTPs (NEB), 0,05 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 64° C, 25'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	350 (0,08 µM), aacggagagtgggtcatcac 351 (0,08 µM), acatgggttaagcacacagg 352 (0,3 µM), cagccctacagccacatgat 353 (0,3 µM), atctctgtgcctcctggaaa	383 (Tshß, Kontrolle) 249 (Sry, Y-Chrom.)
<i>Cldn10</i> -	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 20'' 61° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	202 (0,3 µM), ccactgatgaggggatatc 388 (0,3 µM), gcaagctaattggctacctg	380 (-)
<i>Cldn10</i> +	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 20'' 61° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	201 (0,3 µM), gtgtgtgcacatttgtggg 203 (0,3 µM), agcaatttgatagaatccagc	298 (+)
<i>Cldn10</i> targ	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 20'' 61° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	201 (0,3 µM), gtgtgtgcacatttgtggg 202 (0,3 µM), ccactgatgaggggatatc	328 (targ)
<i>Cldn10</i> +/-flox	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 66° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	204 (0,2 mM), cctgtttgtgcctgtgc 248 (0,2 mM), gcagtgacgcccaggttc	486 (fl) 296 (+)
<i>Cldn10</i> +/-targ/flox	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 66° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	96 (0,2 mM), ggtgggctctatggcttctg 204 (0,2 mM), cctgtttgtgcctgtgc 248 (0,2 mM), gcagtgacgcccaggttc	589 (targ) 486 (fl) 296 (+)
<i>Cldn16</i> +/-targ; Detektion lox	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 58° C, 30'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	114 (0,25 µM), gtgataatccacttaggcgc 115 (0,25 µM), gctaactccagattttcaagg 216 (0,15 µM), gagggcattaacaatggattg	320 (-) 264 (targ) 230 (+)
<i>Cldn16</i> +/-flox	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 57° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	216 (0,15 µM), gagggcattaacaatggattg 249 (0,25 µM), cacttgaagatttactaagatag	401 (fl) 236 (+)
<i>Cldn16</i> +/-targ/flox	1x ThermoPol Puffer (NEB), 1 mM MgCl ₂ , 0,25 mM dNTPs (NEB), 1% DMSO, 0,04 U / µl Taq Polymerase (NEB), 1/25 VT DNA* 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 57° C, 40'' 72° C) x40, 2' 72° C, 4° C ∞	96 (0,15 mM), ggtgggctctatggcttctg 216 (0,25 µM), gagggcattaacaatggattg 249 (0,25 µM), cacttgaagatttactaagatag	451 (targ) 401 (fl) 236 (+)
<i>Cldn10</i> targ Kontroll-PCR	1x ThermoPol Puffer (NEB), 0,2 mM dNTPs (NEB), 0,05 U / µl Taq Thermo-Polymerase (NEB), 1/20 VT ES cell DNA** 2' 94° C, (10'' 94° C, 30'' 57° C, 2' 72° C) x35, 7' 72° C, 4° C ∞	81 (0,3 µM), gggaaactcattccctgttctaag 94 (0,3 µM), tgacggatcgcataagcttg	1361 (targ)
<i>Cldn16</i> targ Kontroll-PCR	1x Gitschierpuffer***, 1 mM MgCl ₂ , 0,5 mM dNTPs, 8% DMSO, 0,1 mM BSA, 0,03 U/µl Taq Polymerase (NEB), 1/20 VT DNA** 5' 94° C, (30'' 94° C, 30'' 53° C, 3' 68° C) x40, 7' 68° C, 4° C ∞	94 (0,1 µM), tgacggatcgcataagcttg 107 (0,1 µM), catccttacttggcctgtctc	1360 (targ)

* Präparationen aus 3.2.2, ** Präparation aus 3.2.1

Tab. 12: qPCR - Primer

Gen	Alias / Protein	NCBI RefSeq	Sequenz Primer for (5'- 3')	Sequenz Primer rev (5'- 3')
Hmbs(2)	Hmbs	NM_013551.2	ggctcagatagcatgcaaga	atgttacgggcagtgattcc
Hprt1	Hprt	NM_013556.2	cctaagatgagcgcaagttgaa	ccacaggactagaacacctgctaa
Ppia	Ppia	NM_008907.1	caaagtctggaccaaacacaaacg	gttcattgccttctttcaccttccc
Tbp	Tbp	NM_013684.3	caaaccagaattgttctcctt	tggtcttctgaatcccttt
Ywhaz	Ywhaz	NM_011740.2	taaatggtctgtcaccgtct	ggaaatactcggtagggtgt
Trpv5	Trpv5	NM_001007572.2	tggtatctgtggttgcaat	tcgataaggattctgtcctcg
Trpv6	Trpv6	NM_022413.3	gggatatgtggcgagagta	ggatgcgttgtctgttgaga
S100g	Calbindin-D9k	NM_009789.2	actgattgaacgcacgctct	acgtgtctccgaacttgctt
Slc8a1(2)	Ncx1	NM_011406.2	catgtgagcccacagaagaa	gtacagcagctgcagggaat
Kl (2)	Klotho	NM_013823.2	ctttccacaggaagaagga	caaggacaggttcccagtggt
Trpm6	Trpm6	NM_153417.1	ggccaatttaggggaagatg	tccaaggtgcagtggtgttc
Cnm2(2)	Acdp2	NM_033569.3	ccatgactccgctagttag	tggatgtcacgtgtccagtt
Atp13a4	Atp13a4	NM_172613.3	agagatgcataggcggttgg	cagcaaggacacacaacaag
Slc12a3	Ncc	NM_019415.1	tggattactctcgggatgct	aggccatgtacagcgaactg
Scnn1a	ENaC α	NM_011324.1	gccagactggagctttgac	gccacttctctgtgccttgt
Scnn1b	ENaC β	NM_011325.1	gggaccagagctcgaatatac	gttggctggagattcctcaa
Scnn1g	ENaC γ	NM_011326.2	gggccagttaaaggcatag	gtacagctcgagcatacca
Wnk1 (2)	Wnk1	NM_198703.1	gtcgaggcccaaagatacaa	acctgttctactccacagt
Wnk4	Wnk4	NM_175638.2	tgtagctccagctgctatgc	tgtgtccactcagagagttc
Stk39	Spak	NM_016866.2	gcaagaacctctgcttgac	gagtgccgtatctagggtta
Ptges	Prostaglandin E2-Synthase	NM_022415.2	ggtttcagcagggtgtcact	cagatttgcagccaggagat
Comt1 (2)	Catechol-o-Methyl-transferase	NM_007744.3	gctcaccatgcaaaccacta	ttcttgggtgcagaggattc
Cyp4a12a(3)	Cyp4a12a	NM_177406.3	cccaatccttctgctcacat	gacaggcaaggagactggaa
Mdk	Midkine	NM_010784.4	agaccatccgcgtgactaag	gctctctggcctctgactt

Elektrophysiologie

Tab. 13: Transepitheliale Messungen I - Lösungen und Formeln

Ringerlösung (modifiziert)	145 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,3 mM Ca-Gluconat, 5 mM D-Glucose, 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4	
TAL-Perfusionslösung	Ringerlösung + 0,1 mM Furosemid	
Badlösung für Na ⁺ -Messungen	30 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,3 mM Ca-Gluconat, 5 mM D-Glucose, 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4	$\left[\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \right] = \frac{[Cl]_l - e^{\frac{VF}{RT}} [Cl]_b}{e^{\frac{VF}{RT}} [Na]_l - [Na]_b}$
Badlösung für Li ⁺ -Messungen	145 mM LiCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,3 mM Ca-Gluconat, 5 mM D-Glucose, 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4	$\left[\frac{P_{Li}}{P_{Na}} \right] = e^{\frac{VF}{RT}} \frac{[Na]_l}{[Li]_b}$
Badlösung für Mg ²⁺ -Messungen	73,5 mM MgCl ₂ , 1,3 mM Ca-Gluconat, 5 mM D-Glucose, 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4	$\left[\frac{P_{Mg}}{P_{Na}} \right] = \frac{[Na]_l}{4[Ca]_b} e^{\frac{VF}{RT}} \left(e^{\frac{VF}{RT}} + 1 \right)$
Badlösung für Ca ²⁺ -Messungen	72,5 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 1,3 mM Ca-Gluconat, 5 mM D-Glucose, 0,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1,6 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,4	$\left[\frac{P_{Ca}}{P_{Na}} \right] = \frac{[Na]_l}{4[Ca]_b} e^{\frac{VF}{RT}} \left(e^{\frac{VF}{RT}} + 1 \right)$

Lösungen und modifizierte Goldman-Gleichung zur Berechnung der Diffusionspotentiale. (entnommen von Prof. Dr. M. Bleich, Universität Kiel. Weitere Erläuterungen siehe Pkt 3.4.5)

Tab. 14: Transepitheliale Messungen II - Messergebnisse

<i>Cldn16 juvenil</i> (9-10 Wochen)	+/+			+/-			-/-		
	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N
Vte (mV)	16,10	1,10	11	15,80	1,00	14	17,40	1,10	14
Rte (Ω×cm ²)	8,30	1,20	11	9,70	0,90	14	10,80	1,50	14
ΔI _{sc} (μA/cm ²)	1906,00	149,00	11	1613,00	115,00	14	1790,00	201,00	14
P _{Na} /P _{Cl}	3,80	0,40	11	3,20	0,20	14	4,10	0,60	14
P _{Li} /P _{Na}	0,78	0,01	11	0,79	0,01	14	0,76	0,02	14
P _{Mg} /P _{Na}	0,60	0,03	11	0,62	0,03	14	0,46	0,04	14
<i>Cldn16 adult</i> (16-17 Wochen)	+/+			+/-			-/-		
	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N
P _{Mg} /P _{Na}	-	-	-	0,69	0,05	6	0,43	0,04	6
P _{Ca} /P _{Na}	-	-	-	0,84	0,01	10	0,54	0,03	13

Messungen

Tab. 15: Analyseergebnisse muriner Proben

<i>Cldn16 juvenil</i>	+/+			+/-			-/-			
	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	
Gewicht Männchen (g)	23,17	0,36	13	-	-	-	21,94	0,83	8	
Gewicht Weibchen (g)	18,26	0,33	10	-	-	-	17,43	0,43	6	
Serum Calcitriol (ng/l)	50,32	4,21	6	74,50	7,47	6	97,75	10,62	6	
Serum PTH (ng/l)	18,89	3,36	9	23,37	3,14	6	51,30	8,01	5	
Serum Kreatinin (mg/dl)	0,14	0,01	6	0,12	0,02	5	0,12	0,01	4	
Serum Na (mmol/l)	145,67	1,44	9	143,29	1,51	7	146,83	1,30	6	
Serum Cl (mmol/l)	107,33	0,94	9	106,57	0,61	7	108,00	1,15	6	
Serum P (mmol/l)	2,36	0,11	9	2,45	0,11	7	2,32	0,17	6	
Serum K (mmol/l)	6,06	0,26	9	6,01	0,27	7	5,98	0,34	6	
Serum Ca (mmol/l)	2,47	0,03	9	2,45	0,03	7	2,41	0,05	6	
Serum Mg (mmol/l)	0,95	0,03	9	0,96	0,02	7	0,85	0,03	6	
Urin pH	6,38	0,08	8	6,36	0,14	7	5,42	0,15	6	
Urin Kreatinin (g/l)	0,23	0,03	9	0,24	0,03	7	0,23	0,04	6	
Urin Na (mg/kg/24h)	172,76	21,84	9	182,20	20,76	7	170,85	16,08	6	
Urin Cl (mg/kg/24h)	97,27	15,31	9	101,62	13,49	7	92,30	10,03	6	
Urin P (mg/kg/24h)	0,34	0,05	9	0,28	0,06	7	0,44	0,08	6	
Urin K (mg/kg/24h)	181,48	24,52	9	171,45	20,15	7	154,19	20,60	6	
Urin Ca (mg/kg/24h)	2,98	0,57	9	4,38	1,19	7	31,12	4,86	6	
Urin Mg (mg/kg/24h)	12,40	1,53	9	13,64	1,72	7	16,81	2,31	6	
Urin PGE2 (ng/kg/24 h)	40,32	10,85	7	-	-	-	26,7	6,2	5	
<i>Cldn16 neonatal (P4)</i>	+/+			+/-			-/-			
	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	
	Serum Ca (mmol/l)	1,95	0,08	6	1,79	0,08	9	1,90	0,09	6
	Serum Mg (mmol/l)	1,25	0,02	6	1,33	0,04	9	1,24	0,05	6
	Urin Ca (mmol/l)	1,74	0,46	9	3,91	0,60	9	10,66	1,00	8
Urin Mg (mmol/l)	6,31	0,70	9	7,40	0,41	12	8,43	0,70	9	
<i>Cldn10 neonatal (P1)</i>	+/+			+/-			-/-			
	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	Mittelw.	SEM	N	
	Gewicht (g)	1,50	0,03	22	1,48	0,02	61	1,49	0,04	18
	Serum Ca (mmol/l)	1,02	0,20	3	1,11	0,13	5	0,89	0,16	4
	Serum Mg (mmol/l)	1,26	0,16	4	1,35	0,04	7	1,30	0,04	5
	Serum Na (mmol/l)	149,57	7,20	7	144,56	1,98	9	155,86	10,05	7
	Serum Cl (mmol/l)	102,43	4,22	7	96,86	1,58	9	104,89	7,20	7
	Serum K (mmol/l)	13,36	0,98	7	12,52	1,07	9	14,34	1,27	7
	Urin Ca (mmol/l)	0,74	0,11	9	0,92	0,12	12	0,53	0,13	11
	Urin Mg (mmol/l)	4,15	0,38	6	3,99	0,17	7	1,57	0,26	7
	Urin Na (mmol/l)	73,43	8,70	7	73,22	7,60	9	69,57	7,81	7
	Urin Cl (mmol/l)	89,43	9,44	7	91,63	5,95	9	72,89	7,82	7
	Urin K (mmol/l)	87,60	8,38	7	84,76	7,25	9	86,76	3,79	7
	Atemzüge / min	90,00	21,47	11	89,50	19,89	26	71,20	27,34	10
	Lungenfeuchtgewicht (g)	34,86	2,50	8	27,06	1,17	10	29,10	5,30	5
	Lungentrockengewicht (g)	5,90	0,23	8	5,01	0,32	10	4,80	0,68	5
	Ratio Feucht / Trocken	5,98	0,55	8	5,49	0,19	10	6,05	0,57	5
	Ratio Feucht / Trocken (%)	17,41	1,11	8	18,41	0,61	10	17,14	1,47	5
	<i>Cldn10-Neonaten - Genotypen</i>	+/+			+/-			-/-		
		61			148			64		
<i>Chi-Quadrat-Test</i>	2,004 (< 5,99 als 0,95 Quantil bei df = 2)									

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen an dem Projekt Beteiligten meinen Dank aussprechen, ohne deren Zutun die Arbeit nicht erfolgreich hätte durchgeführt werden können: Zuallererst möchte ich meinem Betreuer PD Dr. Dominik Müller danken, welcher mir dieses überaus vielseitige Forschungsprojekt überließ, stets mit neuen Ideen die Projekte vorantrieb und mir als Pädiater den direkten Bezug meiner Forschungsarbeit zu klinischen Fragestellungen vermittelte.

Frau PD Dr. Tzschentke danke ich dafür, dass sie sich als Promotiongutachterin bereit erklärt hat und einen reibungslosen Ablauf des Promotionsverfahrens ermöglichte.

Dr. Iwan Meij bin ich für seine kritisch-herausfordernden Fragestellungen dankbar, welche zum Weiterdenken anspornen. Marchel Stuiver danke ich für die Mitarbeit bei den Expressionsanalysen; er war mir außerdem eine große Hilfe, wenn es darum ging, mich in diverse Techniken einzuarbeiten. Mit Kathrin Kopplin hatte ich ein konstruktives Zusammenwirken bei der Einarbeitung in proteinchemische Arbeitsmethoden und beim Aufteilen von Maus-Rufbereitschaften. Für einen großen Teil der praktischen Tätigkeiten, wie Western-Blot-Analysen oder die Abwicklung klinischer Analysen, war Kerstin Sommer eine große Unterstützung. Dr. Julia Thumfart danke ich für die finanzielle Förderung in der Endphase der Promotion und die gute Kooperation bei einer gemeinsamen Versuchsreihe.

Mit Prof. Dr. Michael Fromm und PD Dr. Dorothee Günzel hatte ich in vielen Forschergruppen-Seminaren sehr hilfreiche und konstruktive Beratungen im Hinblick auf praktische Arbeiten als auch administrative Abläufe.

Prof. Dr. Thomas Willnow danke ich für zahlreiche Hilfestellungen und Ratschläge hinsichtlich unseres Projektes, sowie für die Bereitstellung von Material und Arbeitsplätzen für einige Versuchsreihen. Seinen Mitarbeitern bin ich für Hilfen und Unterstützungen bei diversen Analysen dankbar, insbesondere sei Dr. Tilman Breiderhoff erwähnt, der mich in viele Arbeitstechniken einarbeitete und einen Teil der tierexperimentellen Probensammlung übernahm.

Mit zwei Arbeitsgruppen gab es sehr fruchtbare Kooperationen zur Ergänzung unserer Studien: Mitarbeiter der AG Stock / AG Hamelmann, insbesondere Loreen Kirchoff und Christine Seib, waren eine große Hilfe bei präparativen Arbeiten und histologischen Färbungen neonataler Lungenpräparate. Prof. Dr. Markus Bleich und Dr. Qixian Shan danke ich für die Komplettierung unserer *in vivo*-Daten mit *ex vivo*-Untersuchungen an isolierten Tubuli.

Des Weiteren sei auch das gesamte Tierpflegepersonal der experimentellen Einrichtungen von MDC, FEM und CCR dankend erwähnt, welches sich tatkräftig um die Betreuung unserer Mäuse gekümmert hat.

Zuletzt danke ich allen Freunden und Verwandten, welche mir während meiner Doktorarbeit mit Rat, Tat, Zuspruch, Computerhilfe und / oder Korrekturlesen beiseite standen.

Die vorliegende Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Forscherguppe FOR 721, Teilprojekt 4), EuReGene (EU Framework Programme 6) sowie EUNEFRON (EU Framework Programme 7).

.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erstellt zu haben. Hilfen Dritter sind als solche gekennzeichnet.

Weder bin ich in Besitz eines Doktorgrades, noch habe ich mich anderweitig um einen solchen beworben.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, 28.09.2010

(Constanze Will)

Lebenslauf

Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

- Will C, Schewe C, Petersen I, Incidence of HPV in primary and metastatic squamous cell carcinomas of the aerodigestive tract: implications for the establishment of clonal relationships, *Histopathology* **48** (2006), 605-607
- Will C, Schewe C, Schluns K, Petersen I, HPV typing and CGH analysis for the differentiation of primary and metastatic squamous cell carcinomas of the aerodigestive tract, *Cell Oncol.* **28** (2006), 97-105
- Will C, Fromm M, Müller D, Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport, *Perit Dial Int.* **28** (2008), 577-584.
- Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, Stuiver M, Kopplin K, Sommer K, Günzel D, Quersfeld U, Meij I, Shan Q, Bleich M, Willnow TE, Müller D, Targeted deletion of murine *Cldn16* identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca^{2+} and Mg^{2+} wasting, *American Journal of Physiology*, in Druck

Poster- und Konferenzbeiträge

- Will et al., 2006: "Mouse Models to elucidate the Role of Tight Junction Proteins in Renal Ion Homeostasis" (Posterbeitrag mit Auszeichnung, EuReGene Summerschool, Oxford, 21.-22.09.2006)
- Will et al., 2008: "Claudin TJ Proteins in Renal Ion Homeostasis – Analysis of Claudin-16 Deficiency" (Konferenzbeitrag, EuReGene Summerschool, Edinburgh, 30.-31.08.2008)
- Will et al., 2009: "Generation and Characterization of a Murine *Cldn16*-KO Model" (Konferenzbeitrag, Pediatric Nephrology Spring Meeting, Amsterdam, 28.-31.03.2009)

Berlin, 28.09.2010

(Constanze Will)

Literatur

- Abbott, A. (2004): Laboratory animals: the Renaissance rat, *Nature* (Band 428), Nr. 6982, Seite 464-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15057803
- Acharya, P.; Beckel, J.; Ruiz, W. G.; Wang, E.; Rojas, R.; Birder, L. und Apodaca, G. (2004): Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 287), Nr. 2, Seite F305-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15068973
- Alexander, R. T.; Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2008): Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease, *J Am Soc Nephrol* (Band 19), Nr. 8, Seite 1451-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18562569
- Amasheh, S.; Meiri, N.; Gitter, A. H.; Schoneberg, T.; Mankertz, J.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells, *J Cell Sci* (Band 115), Nr. Pt 24, Seite 4969-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12432083
- Amasheh, S.; Schmidt, T.; Mahn, M.; Florian, P.; Mankertz, J.; Tavalali, S.; Gitter, A. H.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2005): Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells, *Cell Tissue Res* (Band 321), Nr. 1, Seite 89-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16158492
- Amy, R. W.; Bowes, D.; Burri, P. H.; Haines, J. und Thurlbeck, W. M. (1977): Postnatal growth of the mouse lung., *J Anat.* (Band 124), Seite 131 - 151. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=914698
- Angelow, S.; El-Husseini, R.; Kanzawa, S. A. und Yu, A. S. (2007): Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 293), Nr. 1, Seite F166-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17389678
- Angelow, S.; Schneeberger, E. E. und Yu, A. S. (2007): Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2, *J Membr Biol* (Band 215), Nr. 2-3, Seite 147-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17516019
- Angelow, S. und Yu, A. S. (2007): Claudins and paracellular transport: an update, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (Band 16), Nr. 5, Seite 459-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17693762
- Arthur, J. M. (2000): The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties, *Tissue Cell* (Band 32), Nr. 5, Seite 446-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11201284
- Bazzoni, G. (2003): The JAM family of junctional adhesion molecules, *Curr Opin Cell Biol* (Band 15), Nr. 5, Seite 525-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14519386
- Ben-Yosef, T.; Belyantseva, I. A.; Saunders, T. L.; Hughes, E. D.; Kawamoto, K.; Van Itallie, C. M.; Beyer, L. A.; Halsey, K.; Gardner, D. J.; Wilcox, E. R.; Rasmussen, J.; Anderson, J. M.; Dolan, D. F.; Forge, A.; Raphael, Y.; Camper, S. A. und Friedman, T. B. (2003): Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration, *Hum Mol Genet* (Band 12), Nr. 16, Seite 2049-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12913076

- Berne, R. M. und Levy, M. N. (2000): Principles of Physiology, 3. Auflage, Mosby, St. Louis, Missouri, ISBN: 0-323-00813-5.
- Bie, P. und Damkjaer, M. (2010): Renin secretion and total body sodium: pathways of integrative control, Clin Exp Pharmacol Physiol (Band 37), Nr. 2, Seite e34 - 42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19843096
- Boros, S.; Bindels, R. J. und Hoenderop, J. G. (2009): Active Ca(2+) reabsorption in the connecting tubule, Pflugers Arch (Band 458), Nr. 1, Seite 99-109. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18989697
- Buehr, M.; Meek, S.; Blair, K.; Yang, J.; Ure, J.; Silva, J.; McLay, R.; Hall, J.; Ying, Q. und Smith, A. (2008): Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts, Cell (Band 135), Seite 1287 - 1298. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19109897
- Capasso, G.; Malnic, G.; Wang, T. und Giebisch, G. (1994): Acidification in the mammalian cortical distal tubule, Kidney Int (Band 45), Seite 1543 - 54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7933802
- Capecchi, M. R. (1989): Altering the genome by homologous recombination, Science (Band 244), Nr. 4910, Seite 1288-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2660260
- Claude, P. (1978): Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens, J Membr Biol (Band 39), Nr. 2-3, Seite 219-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=641977
- Colegio, O. R.; Van Itallie, C.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2003): Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture, Am J Physiol Cell Physiol (Band 284), Nr. 6, Seite C1346-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12700140
- Collins, F. S.; Rossant, J. und Wurst, W. (2007): A mouse for all reasons, Cell (Band 128), Nr. 1, Seite 9-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17218247
- Coppola, V.; Barrick, C. A.; Southon, E. A.; Celeste, A.; Wang, K.; Chen, B.; Haddad el, B.; Yin, J.; Nussenzweig, A.; Subramaniam, A. und Tessarollo, L. (2004): Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities, Development (Band 131), Nr. 20, Seite 5185-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15459109
- Cronin, S. R.; Rao, R. und Hampton, R. Y. (2002): Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca2+ homeostasis, J Cell Biol (Band 157), Nr. 6, Seite 1017-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12058017
- Daugherty, B. L.; Ward, C.; Smith, T.; Ritzenthaler, J. D. und Koval, M. (2007): Regulation of heterotypic claudin compatibility, J Biol Chem (Band 282), Nr. 41, Seite 30005-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17699514
- Davidson, A. M.; Cameron, S. J.; Grunfeld, J. P.; Ponticelli, C.; Ritz, E.; Winearls, C. G.; van Ypersele, C. (2008): Oxford Textbook of Clinical Nephrology, 3. Auflage, Oxford University Press, ISBN: 0198508247.
- Demello, D. E.; Mahmoud, S.; Ryerse, J. und Hoffmann, J. W. (2002): Generation and characterization of a conditionally immortalized lung clara cell line from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse, In Vitro Cell Dev Biol Anim (Band 38), Nr. 3, Seite 154-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12026164
- Diamond, J. M. (1977): Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence, Physiologist (Band 20), Nr. 1, Seite 10-8. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16304
- Dubose, T. D. und Hamm, L. (2002): Acid-Base Elektrolyte Disorders. A Companion to Brenner and Rectors THE KIDNEY, Elsevier LTD, Oxford ISBN: 0721689566
- Eisenman, G. (1962): Cation selective glass electrodes and their mode of operation, Biophys J (Band 2), Nr. 2 Pt 2, Seite 259-323. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13889686
- Elin, R. J. (1994): Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte, Am J Clin Pathol (Band 102), Nr. 5, Seite 616-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7942627
- Enck, A. H.; Berger, U. V. und Yu, A. S. (2001): Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney, Am J Physiol Renal Physiol (Band 281), Nr. 5, Seite F966-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11592954
- Erlj, D. (1976): Solute transport across isolated epithelia, Kidney Int (Band 9), Nr. 2, Seite 76-87. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=940265
- Fujita, H.; Sugimoto, K.; Inatomi, S.; Maeda, T.; Osanai, M.; Uchiyama, Y.; Yamamoto, Y.; Wada, T.; Kojima, T.; Yokozaki, H.; Yamashita, T.; Kato, S.; Sawada, N. und Chiba, H. (2008): Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes, Mol Biol Cell. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18287530
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998): Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, J Cell Biol (Band 141), Nr. 7, Seite 1539-50. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9647647
- Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K.; Yoshida, Y.; Haratake, A.; Sugitani, Y.; Noda, T.; Kubo, A. und Tsukita, S. (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, J Cell Biol (Band 156), Nr. 6, Seite 1099-111. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11889141
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S. und Tsukita, S. (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, J Cell Biol (Band 123), Nr. 6 Pt 2, Seite 1777-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8276896
- Furuse, M.; Sasaki, H. und Tsukita, S. (1999): Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands, J Cell Biol (Band 147), Nr. 4, Seite 891-903. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10562289
- Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): Claudins in occluding junctions of humans and flies, Trends Cell Biol (Band 16), Nr. 4, Seite 181-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16537104
- Gates, C. A. und Cox, M. M. (1988): FLP recombinase is an enzyme, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 85), Nr. 13, Seite 4628-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3290899
- Gimenez, I. und Forbush, B. (2003): Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein, J Biol Chem (Band 278), Nr. 29, Seite 26946-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12732642

- Gow, A.; Davies, C.; Southwood, C. M.; Frolenkov, G.; Chrustowski, M.; Ng, L.; Yamauchi, D.; Marcus, D. C. und Kachar, B. (2004): Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function, *J Neurosci* (Band 24), Nr. 32, Seite 7051-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15306639
- Gow, A.; Southwood, C. M.; Li, J. S.; Pariali, M.; Riordan, G. P.; Brodie, S. E.; Danias, J.; Bronstein, J. M.; Kachar, B. und Lazzarini, R. A. (1999): CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice, *Cell* (Band 99), Nr. 6, Seite 649-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10612400
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005): Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter, *Physiol Genomics* (Band 22), Nr. 3, Seite 382-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15899945
- Günzel, D.; Stuver, M.; Kausalya, P. J.; Haisch, L.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Meij, I. C.; Hunziker, W.; Fromm, M. und Muller, D. (2009): Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function, *J Cell Sci* (Band 122), Nr. Pt 10, Seite 1507-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19383724
- Günzel, D. und Yu, A. S. (2009): Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle, *Pflugers Arch* (Band 458), Nr. 1, Seite 77-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18795318
- Hackett, B. P.; Shimizu, N. und Gitlin, J. D. (1992): Clara cell secretory protein gene expression in bronchiolar epithelium, *Am J Physiol* (Band 262), Nr. 4 Pt 1, Seite L399-404. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1566856
- Hadj-Rabia, S.; Baala, L.; Vabres, P.; Hamel-Teillac, D.; Jacquemin, E.; Fabre, M.; Lyonnet, S.; De Prost, Y.; Munnich, A.; Hadchouel, M. und Smahi, A. (2004): Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease, *Gastroenterology* (Band 127), Nr. 5, Seite 1386-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15521008
- Hamm, L. L.; Feng, Z. und Hering-Smith, K. S. (2010): Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (Band 19), Nr. 1, Seite 98-105. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19996890
- Hartner, A.; Cordasic, N.; Klanke, B.; Veelken, R. und Hilgers, K. F. (2003): Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice, *Nephrol Dial Transplant* (Band 18), Nr. 10, Seite 1999-2004. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13679473
- Harvilchuck, J. A.; Zurbrugg, R. J. und Carlson, G. P. (2008): CC10 mRNA and protein expression in Clara cells of CD-1 mice following exposure to styrene or its metabolites styrene oxide or 4-vinylphenol, *Toxicol Lett* (Band 183), Nr. 1-3, Seite 28-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18926891
- Hayashi, S. und McMahon, A. P. (2002): Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse, *Dev Biol* (Band 244), Nr. 2, Seite 305-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11944939
- Hernando, N.; Biber, J.; Forster, I. und Murer, H. (2005): Recent advances in renal phosphate transport, *Ther Apher Dial* (Band 9), Nr. 4, Seite 323-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16076375

- Hou, J.; Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (2005): Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions, *J Cell Sci* (Band 118), Nr. Pt 21, Seite 5109-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16234325
- Hou, J.; Renigunta, A.; Gomes, A. S.; Hou, M.; Paul, D. L.; Waldegger, S. und Goodenough, D. A. (2009): Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 106), Nr. 36, Seite 15350-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19706394
- Hou, J.; Shan, Q.; Wang, T.; Gomes, A. S.; Yan, Q.; Paul, D. L.; Bleich, M. und Goodenough, D. A. (2007): Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 23, Seite 17114-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17442678
- Hummeler, E.; Barker, P.; Gatzky, J.; Beermann, F.; Verdumo, C.; Schmidt, A.; Boucher, R. und Rossier, B. C. (1996): Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice, *Nat Genet* (Band 12), Nr. 3, Seite 325-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8589728
- Ikari, A.; Ito, M.; Okude, C.; Sawada, H.; Harada, H.; Degawa, M.; Sakai, H.; Takahashi, T.; Sugatani, J. und Miwa, M. (2008a): Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway, *J Cell Physiol* (Band 214), Nr. 1, Seite 221-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17559069
- Ikari, A.; Kinjo, K.; Atomi, K.; Sasaki, Y.; Yamazaki, Y. und Sugatani, J. (2009): Extracellular Mg(2+) regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation, *Biochim Biophys Acta*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19914201
- Ikari, A.; Matsumoto, S.; Harada, H.; Takagi, K.; Degawa, M.; Takahashi, T.; Sugatani, J. und Miwa, M. (2006a): Dysfunction of paracellin-1 by dephosphorylation in Dahl salt-sensitive hypertensive rats, *J Physiol Sci* (Band 56), Nr. 5, Seite 379-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16959063
- Ikari, A.; Matsumoto, S.; Harada, H.; Takagi, K.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Degawa, M. und Miwa, M. (2006b): Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions, *J Cell Sci* (Band 119), Nr. Pt 9, Seite 1781-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16608877
- Ikari, A.; Okude, C.; Sawada, H.; Sasaki, Y.; Yamazaki, Y.; Sugatani, J.; Degawa, M. und Miwa, M. (2008b): Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16, *Biochim Biophys Acta* (Band 1778), Nr. 1, Seite 283-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17976367
- Ikenouchi, J.; Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H. und Tsukita, S. (2005): Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *J Cell Biol* (Band 171), Nr. 6, Seite 939-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16365161
- Ikenouchi, J.; Matsuda, M.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail, *J Cell Sci* (Band 116), Nr. Pt 10, Seite 1959-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12668723
- Inai, T.; Kobayashi, J. und Shibata, Y. (1999): Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells, *Eur J Cell Biol* (Band 78), Nr. 12, Seite 849-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669103
- Iwasato, T.; Datwani, A.; Wolf, A. M.; Nishiyama, H.; Taguchi, Y.; Tonegawa, S.; Knopfel, T.; Erzurumlu, R. S. und Itohara, S. (2000): Cortex-restricted disruption of NMDAR1 im-

- pairs neuronal patterns in the barrel cortex, *Nature* (Band 406), Nr. 6797, Seite 726-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10963597
- Jones, G.; Strugnell, S. A. und DeLuca, H. F. (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D, *Physiol Rev* (Band 78), Nr. 4, Seite 1193-231. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9790574
- Kari, J. A.; Farouq, M. und Alshaya, H. O. (2003): Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, *Pediatr Nephrol* (Band 18), Nr. 6, Seite 506-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12720080
- Kausalya, P. J.; Amasheh, S.; Gunzel, D.; Wurps, H.; Muller, D.; Fromm, M. und Hunziker, W. (2006): Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16, *J Clin Invest* (Band 116), Nr. 4, Seite 878-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16528408
- Knepper, M. A. und Brooks, H. L. (2001): Regulation of the sodium transporters NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney, *Curr Opin Nephrol Hypertens* (Band 10), Nr. 5, Seite 655-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11496061
- Kohan, D. E. (2008): Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease, *Kidney Int* (Band 74), Nr. 4, Seite 427-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18418351
- Kokko, J. P. (1970): Sodium chloride and water transport in the descending limb of Henle, *J Clin Invest* (Band 49), Nr. 10, Seite 1838-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5460286
- Konrad, M.; Hou, J.; Weber, S.; Dotsch, J.; Kari, J. A.; Seeman, T.; Kuwertz-Broking, E.; Peco-Antic, A.; Tasic, V.; Dittrich, K.; Alshaya, H. O.; von Vigier, R. O.; Gallati, S.; Goode-nough, D. A. und Schaller, A. (2008): CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, *J Am Soc Nephrol* (Band 19), Nr. 1, Seite 171-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18003771
- Konrad, M.; Schaller, A.; Seelow, D.; Pandey, A. V.; Waldegger, S.; Lesslauer, A.; Vitzthum, H.; Suzuki, Y.; Luk, J. M.; Becker, C.; Schlingmann, K. P.; Schmid, M.; Rodriguez-Soriano, J.; Ariceta, G.; Cano, F.; Enriquez, R.; Juppner, H.; Bakkaloglu, S. A.; Hediger, M. A.; Gallati, S.; Neuhauss, S. C.; Nurnberg, P. und Weber, S. (2006): Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement, *Am J Hum Genet* (Band 79), Nr. 5, Seite 949-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17033971
- Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S. L.; Haseloff, R. F.; Piontek, J. und Blasig, I. E. (2008): Structure and function of claudins, *Biochim Biophys Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 631-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18036336
- Kriegs, J. O.; Homann, V.; Kinne-Saffran, E. und Kinne, R. K. (2007): Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands, *Histochem Cell Biol* (Band 128), Nr. 1, Seite 45-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17551748
- Krug, S. M.; Amasheh, S.; Richter, J. F.; Milatz, S.; Gunzel, D.; Westphal, J. K.; Huber, O.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2009): Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability, *Mol Biol Cell* (Band 20), Nr. 16, Seite 3713-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19535456

- Kwasnicka-Crawford, D. A.; Carson, A. R.; Roberts, W.; Summers, A. M.; Rehnstrom, K.; Jarvela, I. und Scherer, S. W. (2005): Characterization of a novel cation transporter ATPase gene (ATP13A4) interrupted by 3q25-q29 inversion in an individual with language delay, *Genomics* (Band 86), Nr. 2, Seite 182-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15925480
- Laires, M. J.; Monteiro, C. P. und Bicho, M. (2004): Role of cellular magnesium in health and human disease, *Front Biosci* (Band 9), Seite 262-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14766364
- Leheste, J. R.; Melsen, F.; Wellner, M.; Jansen, P.; Schlichting, U.; Renner-Muller, I.; Andreasen, T. T.; Wolf, E.; Bachmann, S.; Nykjaer, A. und Willnow, T. E. (2003): Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect, *FASEB J* (Band 17), Nr. 2, Seite 247-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12475886
- Lewis, D. L. und Wolff, J. A. (2005): Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection, *Methods Enzymol* (Band 392), Seite 336-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15644191
- Lisewski, U.; Shi, Y.; Wrackmeyer, U.; Fischer, R.; Chen, C.; Schirdewan, A.; Juttner, R.; Rathjen, F.; Poller, W.; Radke, M. H. und Gotthardt, M. (2008): The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication, *J Exp Med* (Band 205), Nr. 10, Seite 2369-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18794341
- Maddox, D. A. und Gennari, F. J. (1987): The early proximal tubule: a high-capacity delivery-responsive reabsorptive site, *Am J Physiol* (Band 252), Nr. 4 Pt 2, Seite F573-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3551629
- Mankertz, J.; Waller, J. S.; Hillenbrand, B.; Tavalali, S.; Florian, P.; Schoneberg, T.; Fromm, M. und Schulzke, J. D. (2002): Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 298), Nr. 5, Seite 657-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12419305
- Markov, A. G.; Shadrin, L. V.; Veshniakova, Alu; Amasheh, S. und Fromm, M. (2006): [The tight junction proteins claudin-2 and -16 expression in mammary epithelium of mice], *Russkii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I. M. Sechenova* (Band 92), Nr. 11, Seite 1382-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17385432
- Markov, A. G.; Veshnyakova, A.; Fromm, M.; Amasheh, M. und Amasheh, S. (2010): Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine, *J Comp Physiol B*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20049600
- Mensenkamp, A. R.; Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2007): TRPV5, the gateway to Ca²⁺ homeostasis, *Handb Exp Pharmacol*, Nr. 179, Seite 207-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17217059
- Milatz, S.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Günzel, D.; Müller, D.; Schulzke, J. D.; Amasheh, S. und Fromm, M. (2010): Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes, *Biochem Biophys Acta* (Band 1798), Nr. 11, Seite 2048 - 57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20655293
- Miller, J. und Gordon, C. (2005): The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins, *FEBS Lett* (Band 579), Nr. 15, Seite 3224-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15943965

- Miller, M. D. und Marty, M. A. (2010): Impact of environmental chemicals on lung development., *Environ Health Perspect.* (Band 118), Nr. 8, Seite 1155 - 1164. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20444669
- Mitic, L. L.; Unger, V. M. und Anderson, J. M. (2003): Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4, *Protein Sci* (Band 12), Nr. 2, Seite 218-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12538885
- Miyamoto, T.; Morita, K.; Takemoto, D.; Takeuchi, K.; Kitano, Y.; Miyakawa, T.; Nakayama, K.; Okamura, Y.; Sasaki, H.; Miyachi, Y.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2005): Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice, *J Cell Biol* (Band 169), Nr. 3, Seite 527-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15883201
- Müller, D.; Kausalya, P. J.; Bockenbauer, D.; Thumfart, J.; Meij, I. C.; Dillon, M. J.; van't Hoff, W. und Hunziker, W. (2006a): Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 91), Nr. 8, Seite 3076-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16705067
- Müller, D.; Kausalya, P. J.; Claverie-Martin, F.; Meij, I. C.; Eggert, P.; Garcia-Nieto, V. und Hunziker, W. (2003): A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting, *Am J Hum Genet* (Band 73), Nr. 6, Seite 1293-301. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14628289
- Müller, D.; Kausalya, P. J.; Meij, I. C. und Hunziker, W. (2006b): Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel Claudin-16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail, *Hum Mol Genet* (Band 15), Nr. 7, Seite 1049-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16501001
- Muto, S.; Hata, M.; Taniguchi, J.; Tsuruoka, S.; Moriwaki, K.; Saitou, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Fujimura, A.; Imai, M.; Kusano, E.; Tsukita, S. und Furuse, M. (2010): Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 107), Nr. 17, Seite 8011-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20385797
- Nakano, Y.; Kim, S. H.; Kim, H. M.; Sanneman, J. D.; Zhang, Y.; Smith, R. J.; Marcus, D. C.; Wangemann, P.; Nessler, R. A. und Banfi, B. (2009): A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing, *PLoS Genet* (Band 5), Nr. 8, Seite e1000610. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19696885
- Nijenhuis, T.; Hoenderop, J. G.; van der Kemp, A. W. und Bindels, R. J. (2003): Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney, *J Am Soc Nephrol* (Band 14), Nr. 11, Seite 2731-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14569082
- Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *J Cell Biol* (Band 161), Nr. 3, Seite 653-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12743111
- Norman, A. W.; Sergeev, I. N.; Bishop, J. E. und Okamura, W. H. (1993): Selective Biological Response by Target Organs (Intestine, Kidney, and Bone) to 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Two Analogues, *Cancer Res* (Band 53), Seite 3935 - 3942. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8395333
- Ohba, Y.; Kitagawa, H.; Kitoh, K.; Sasaki, Y.; Takami, M.; Shinkai, Y. und Kunieda, T. (2000): A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle, *Genomics* (Band 68), Nr. 3, Seite 229-36. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10995564
- Okada, K.; Ishikawa, N.; Fujimori, K.; Goryo, M.; Ikeda, M.; Sasaki, J.; Watanabe, D.; Takasuga, A.; Hirano, T. und Sugimoto, Y. (2005): Abnormal development of nephrons in claudin-16-defective Japanese black cattle, *J Vet Med Sci* (Band 67), Nr. 2, Seite 171-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15750313
- Orgeig, S.; Bernhard, W.; Biswas, S. C.; Daniels, C. B.; Hall, S. B.; Hetz, S. K.; Lang, C. J.; Maina, J. N.; Panda, A. K.; Perez-Gil, J.; Possmayer, F.; Veldhuizen, R. A. und Yan, W. (2007): The anatomy, physics, and physiology of gas exchange surfaces: is there a universal function for pulmonary surfactant in animal respiratory structures?, *Integrative and Comparative Biology* (Band 47), Nr. 4, Seite 610 - 627. URL: <http://icb.oxfordjournals.org/cgi/content/short/47/4/610>
- Ouban, A. und Ahmed, A. A. (2010): Claudins in human cancer: a review, *Histol Histopathol* (Band 25), Nr. 1, Seite 83-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19924644
- Pack, R. J.; Al-Ugaily, L. H. und Morris, G. (1981): The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study, *J Anat* (Band 132), Nr. Pt 1, Seite 71-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7275793
- Pastva, A. M.; Wright, J. R. und Williams, K. L. (2007): Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease, *Proc Am Thorac Soc* (Band 4), Nr. 3, Seite 252-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17607008
- Perl, A. K.; Tichelaar, J. W. und Whitsett, J. A. (2002): Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse, *Transgenic Res* (Band 11), Nr. 1, Seite 21-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11874100
- Portale, A. A.; Halloran, B. P. und Morris, R. C., Jr. (1987): Dietary intake of phosphorus modulates the circadian rhythm in serum concentration of phosphorus. Implications for the renal production of 1,25-dihydroxyvitamin D, *J Clin Invest* (Band 80), Nr. 4, Seite 1147-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3654974
- Powell, D. W. (1981): Barrier function of epithelia, *Am J Physiol* (Band 241), Nr. 4, Seite G275-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7032321
- Praga, M.; Vara, J.; Gonzalez-Parra, E.; Andres, A.; Alamo, C.; Araque, A.; Ortiz, A. und Rodicio, J. L. (1995): Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, *Kidney Int* (Band 47), Nr. 5, Seite 1419-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7637271
- Renkema, K. Y.; Velic, A.; Dijkman, H. B.; Verkaart, S.; van der Kemp, A. W.; Nowik, M.; Timmermans, K.; Doucet, A.; Wagner, C. A.; Bindels, R. J. und Hoenderop, J. G. (2009): The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis, *J Am Soc Nephrol* (Band 20), Nr. 8, Seite 1705-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19470676
- Revell, P. A.; Grossman, W. J.; Thomas, D. A.; Cao, X.; Behl, R.; Ratner, J. A.; Lu, Z. H. und Ley, T. J. (2005): Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions, *J Immunol* (Band 174), Nr. 4, Seite 2124-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15699143
- Reynolds, S. D.; Reynolds, P. R.; Snyder, J. C.; Whyte, F.; Paavola, K. J. und Stripp, B. R. (2007): CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 293), Nr. 1, Seite L114-23. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17384087
- Richardson, C. und Alessi, D. R. (2008): The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway, *J Cell Sci* (Band 121), Nr. Pt 20, Seite 3293-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18843116
- Rocha, A. S. und Kokko, J. P. (1973): Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport, *J Clin Invest* (Band 52), Nr. 3, Seite 612-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4685086
- Rodriguez, C. I.; Buchholz, F.; Galloway, J.; Sequerra, R.; Kasper, J.; Ayala, R.; Stewart, A. F. und Dymecki, S. M. (2000): High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP, *Nat Genet* (Band 25), Nr. 2, Seite 139-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10835623
- Rosenthal, R.; Milatz, S.; Krug, S. M.; Oelrich, B.; Schulzke, J. D.; Amasheh, S.; Günzel, D. und Fromm, M. (2010): Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel, *J Cell Sci* (Band 123), Seite 1913 - 21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20460438
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol Biol Cell* (Band 11), Nr. 12, Seite 4131-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11102513
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, ISBN: 0-87969-577-3.
- Sandy, P.; Ventura, A. und Jacks, T. (2005): *Mammalian RNAi: a practical guide*, Biotechniques (Band 39), Nr. 2, Seite 215-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16116795
- Sauer, B. und Henderson, N. (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 85), Nr. 14, Seite 5166-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2839833
- Sayer, J. A.; Carr, G. und Simmons, N. L. (2004): Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney, *Clin Sci (Lond)* (Band 106), Nr. 6, Seite 549-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15027893
- Sayer, J. A. und Simmons, N. L. (2002): Urinary stone formation: Dent's disease moves understanding forward, *Exp Nephrol* (Band 10), Nr. 3, Seite 176-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12053119
- Schneider, L. (2009): Genotyp-/Phänotyp-Analyse und klinische Charakterisierung von 25 Familien mit familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC), Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität, Marburg.
- Schulzke, J. D.; Gitter, A. H.; Mankertz, J.; Spiegel, S.; Seidler, U.; Amasheh, S.; Saitou, M.; Tsukita, S. und Fromm, M. (2005): Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice, *Biochim Biophys Acta* (Band 1669), Nr. 1, Seite 34-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15842997
- Schwenk, F.; Baron, U. und Rajewsky, K. (1995): A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells, *Nucleic Acids Res* (Band 23), Nr. 24, Seite 5080-1. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8559668

- Simon, D. B.; Lu, Y.; Choate, K. A.; Velazquez, H.; Al-Sabban, E.; Praga, M.; Casari, G.; Bettinelli, A.; Colussi, G.; Rodriguez-Soriano, J.; McCredie, D.; Milford, D.; Sanjad, S. und Lifton, R. P. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption, *Science* (Band 285), Nr. 5424, Seite 103-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10390358
- Stobrawa, S. M.; Breiderhoff, T.; Takamori, S.; Engel, D.; Schweizer, M.; Zdebik, A. A.; Bosl, M. R.; Ruether, K.; Jahn, H.; Draguhn, A.; Jahn, R. und Jentsch, T. J. (2001): Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus, *Neuron* (Band 29), Nr. 1, Seite 185-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11182090
- Stricklett, P. K.; Taylor, D.; Nelson, R. D. und Kohan, D. E. (2003): Thick ascending limb-specific expression of Cre recombinase, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 285), Nr. 1, Seite F33-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12644440
- Sugiyama, A.; Ozaki, K.; Miyazaki, Tanabe, Y.; Takeuchi, T. und Narama, I. (2007): Renal dysplasia unrelated to claudin-16 deficiency in Japanese Black cattle, *J Comp Pathol* (Band 137), Nr. 1, Seite 71-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17537453
- Tamura, A.; Kitano, Y.; Hata, M.; Katsuno, T.; Moriwaki, K.; Sasaki, H.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Noda, T.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2008): Megaintestine in claudin-15-deficient mice, *Gastroenterology* (Band 134), Nr. 2, Seite 523-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18242218
- Tatum, R.; Zhang, Y.; Salleng, K.; Lu, Z.; Lin, J. J.; Lu, Q.; Jeansonne, B. G.; Ding, L. und Chen, Y. H. (2010): Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 298), Nr. 1, Seite F24-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19759267
- Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell* (Band 51), Nr. 3, Seite 503-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2822260
- Truett, G. E.; Heeger, P.; Mynatt, R. L.; Truett, A. A.; Walker, J. A. und Warman, M. L. (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT), *Biotechniques* (Band 29), Nr. 1, Seite 52, 54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10907076
- Turgeon, B. und Meloche, S. (2009): Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases, *Physiol Rev* (Band 89), Nr. 1, Seite 1-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19126753
- Turksen, K. und Troy, T. C. (2002): Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6, *Development* (Band 129), Nr. 7, Seite 1775-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11923212
- Vallipuram, J.; Grenville, J. und Crawford, D. A. (2009): The E646D-ATP13A4 Mutation Associated with Autism Reveals a Defect in Calcium Regulation, *Cell Mol Neurobiol*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19731010
- van Abel, M.; Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2005): The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (Band 371), Nr. 4, Seite 295-306. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15747113
- Van Itallie, C. M.; Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2003): Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 285), Nr. 6, Seite F1078-84. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13129853
- Van Itallie, C. M.; Holmes, J.; Bridges, A.; Gookin, J. L.; Coccaro, M. R.; Proctor, W.; Colegio, O. R. und Anderson, J. M. (2008): The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2, *J Cell Sci* (Band 121), Nr. Pt 3, Seite 298-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18198187
- Van Itallie, C. M.; Rogan, S.; Yu, A.; Vidal, L. S.; Holmes, J. und Anderson, J. M. (2006): Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 291), Nr. 6, Seite F1288-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16804102
- Walder, R. Y.; Landau, D.; Meyer, P.; Shalev, H.; Tsolia, M.; Borochowitz, Z.; Boettger, M. B.; Beck, G. E.; Englehardt, R. K.; Carmi, R. und Sheffield, V. C. (2002): Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia, *Nat Genet* (Band 31), Nr. 2, Seite 171-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12032570
- Whitsett, J. A.; Wert, S. E. und Weaver, T. E. (2010): Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease, *Annu Rev Med.* (Band 61), Seite 105 - 119. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19824815
- Will, C.; Breiderhoff, T.; Thumfart, J.; Stuver, M.; Kopplin, K.; Sommer, K.; Günzel, D.; Querfeld, U.; Meij, I. C.; Shan, Q.; Bleich, M.; Willnow, T. E. und Müller, D. (2010): Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting, *Am J Physiol Renal Physiol*, in Druck. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20147368
- Willnow, T. E. und Herz, J. (1994): Homologous recombination for gene replacement in mouse cell lines, *Methods Cell Biol* (Band 43 Pt A), Seite 305-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7823869
- Wu, F. (2007): Conditional targeting in the kidney, *Nephron Physiol* (Band 107), Nr. 1, Seite p10-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17657166
- Xia, J. Q.; Rickaby, D. A.; Kelly, K. J.; Choi, H.; Dawson, C. A. und Kurup, V. P. (1999): Immune response and airway reactivity in wild and IL-4 knockout mice exposed to latex allergens, *Int Arch Allergy Immunol* (Band 118), Nr. 1, Seite 23-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9925959
- Yu, A. S.; Enck, A. H.; Lencer, W. I. und Schneeberger, E. E. (2003): Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 19, Seite 17350-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12615928
- Zemke, A. C.; Snyder, J. C.; Brockway, B. L.; Drake, J. A.; Reynolds, S. D.; Kaminski, N. und Stripp, B. R. (2009): Molecular staging of epithelial maturation using secretory cell-specific genes as markers, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 40), Nr. 3, Seite 340-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18757308